

DE GRUYTER

2017 · VOLUME 23 · ISSUE 4
ISSN 0947-0875 · e-ISSN 1868-856X

NEUROFORUM

ORGAN DER NEUROWISSENSCHAFTLICHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. (NWG)

CHEFREDAKTEUR

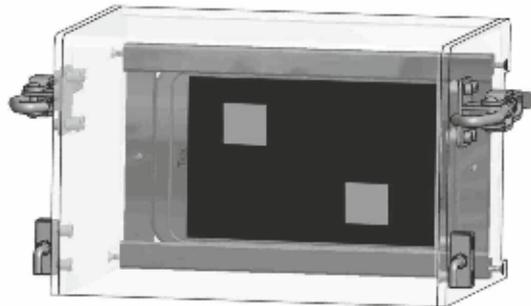
Heiko J. Luhmann, Mainz



DE
G

www.degruyter.com/journals/nf

NEW



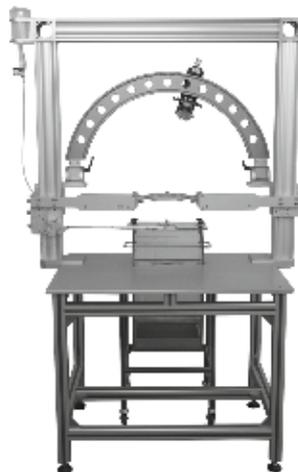
Newly developed Thomas InCage Training System *for non-human primates*

- **Portable and flexible mountable** cage system
- **Reduce operating costs** for training-supervision
- Optional **reward system**
- Increases **animal welfare**

The ICTS is a flexible, light-weight, fully-automatic device for the training of behavioral and cognitive paradigms and enrichment of NHPs in their home cages instead of the classic primate chair restraint training.

Well-proven Stereotaxic Instrument for NHPs Precision Positioning System

- Three-point head fixation
- Fully integrated stereotaxic system
- Includes a reward system
- Several Microdrives can be adapted to the system
- Customizable
- Many degrees of freedom



The Precision Positioning System (**PPS**) is a well proven and robust system for your **research with NHPs**.

PPS allows to flexibly **mount and position a microdrive system**.

Visit www.ThomasRECORDING.com for more information

NEUROFORUM

HERAUSGEGEBEN VON

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. (NWG)

CHEFREDAKTEUR

Heiko J. Luhmann, Mainz

REDAKTION

Meino Alexandra Gibson, Susanne Hannig, Berlin

REDAKTIONSGREMIUM

*Mathias Bähr, Göttingen
Niels Birbaumer, Tübingen
Alexander Borst, Martinsried
Sebastian Brandner, London, US
Katharina Braun, Magdeburg
Nils Brose, Göttingen
Ansgar Büschges, Köln
Thomas Deller, Frankfurt/M.
Ricarda Diem, Heidelberg
Ulrich Dirnagl, Berlin
Andreas Draguhn, Heidelberg
Jens Eilers, Leipzig
Herta Flor, Mannheim
Eckhard Friauf, Kaiserslautern
Giovanni Galizia, Konstanz
Magdalena Götz, München
Benedikt Grothe, München
Sonja Grün, Jülich
Onur Güntürkün, Bochum
Eckhart Gundelfinger, Magdeburg
Ileana Hanganu-Opatz, Hamburg
Andreas Heinz, Berlin
Charlotte Helfrich-Förster, Würzburg
Moritz Helmstädter, Frankfurt/M.*

*Michael Heneka, Bonn
Anton Hermann, Salzburg, Österreich
Andreas Herz, München
Isabella Heuser, Berlin
Sigismund Huck, Wien, Österreich
Mark Hübener, Martinsried
Reinhard Jahn, Göttingen
Peter Jonas, Klosterneuburg,
Österreich
Sabine Kastner, Princeton, USA
Helmut Kettenmann, Berlin
Frank Kirchhoff, Homburg
Christian Klämbt, Münster
Thomas Klockgether, Bonn
Matthias Kneussel, Hamburg
Michael Koch, Bremen
Arthur Konnerth, München
Sigrun Korsching, Köln
Kerstin Kriegelstein, Freiburg
Trese Leinders-Zufall, Homburg
Wolfgang Löscher, Hannover
Siegrid Löwel, Göttingen
Albert Christian Ludolph, Ulm
Hanspeter A. Mallot, Tübingen*

*Denise Manahan-Vaughan, Bochum
Thomas Möller, Cambridge, USA
Ulrike Müller, Heidelberg
Thomas Münte, Lübeck
Roger Nitsch, Zürich, Schweiz
Christian Pape, Münster
Hans-Joachim Pflüger, Berlin
Josef Rauschecker, Washington, USA
Angelika Richter, Leipzig
Christine R. Rose, Düsseldorf
Stefan Rotter, Freiburg
Susanne Schoch-McGovern, Bonn
Rainer Schwarting, Marburg
Mikael Simons, Göttingen
Christian Steinhäuser, Bonn
Monika Stengl, Kassel
Christiane Thiel, Oldenburg
Stefan Treue, Göttingen
Petra Wahle, Bochum
Bernd Weber, Bonn
Christian Wegener, Würzburg
Florentin Wörgötter, Göttingen*

ABSTRACTED/INDEXED IN Baidu Scholar · Case · Celdes · CNKI Scholar (China National Knowledge Infrastructure) · CNPIEC · EBSCO Discovery Service · Elsevier: SCOPUS · Google Scholar · J-Gate · JournalGuide · JournalTOCs · KESLI-NDSL (Korean National Discovery for Science Leaders) · Microsoft Academic · Naviga (Softweco) · Primo Central (ExLibris) · ReadCube · SCImago (SJR) · Summon (Serials Solutions/ProQuest) · TDNet · Ulrich's Periodicals Directory/ulrichsweb · WanFang Data · WorldCat (OCLC)

ISSN 0947-0875 · e-ISSN 1868-856X

Alle Informationen zur Zeitschrift, wie Hinweise für Autoren, Open Access, Bezugsbedingungen und Bestellformulare, sind online zu finden unter <https://www.degruyter.com/view/j/nf>

HERAUSGEBER Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. (NWG), Kontakt: Meino Alexandra Gibson, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Robert-Rössle-Straße 10, 13092 Berlin, Tel.: +49 (0)30 9406 3336, gibson@mdc-berlin.de, www.nwg-info.de

CHEFREDAKTEUR Prof. Dr. Heiko J. Luhmann, Institute of Physiology, University Medical Center, Duesbergweg 6, D-55128 Mainz (Germany), Tel.: +49 (0)6131 39 26070, <http://physiologie.uni-mainz.de/physio/luhmann/index.htm>

REDAKTION Susanne Hannig, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Robert-Rössle-Str. 10, 13092 Berlin (Germany), Tel.: +49 (0)30 9406 3336, gibson@mdc-berlin.de

JOURNAL MANAGER Torsten Krüger, De Gruyter, Genthiner Straße 13, 10785 Berlin, Germany. Tel.: +49 (0)30 260 05-173, Fax: +49 (0)30 260 05-250, E-Mail: Neuroforum.Editorial@degruyter.com

ANZEIGENVERANTWORTLICHE top-ad Bernd Beutel, Schlossergäßchen 10, 69469 Weinheim, Tel.: +49 (0)6201 290 92-0, Fax +49 (0)6201 290 92-20

© 2017 Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston

COVER ILLUSTRATION Aufnahme einer primären CTL mit angefärbtem Mikrotubuli und Zentrosom (MTOC) (Jens Rettig und David R. Stevens, Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), S. 223 ff.)

SATZ fidus Publikations-Service GmbH, Nördlingen

DRUCK Franz X. Stücker Druck und Verlag e.K., Ettenheim
Printed in Germany



VORSTAND DER AMTSPERIODE 2017–2019

PRÄSIDENT

Eckhard Friauf, Kaiserslautern

Kognitive Neurowissenschaften

Hanspeter A. Mallot, Tübingen

VIZEPRÄSIDENT

Albert Christian Ludolph, Ulm

Molekulare Neurobiologie

Matthias Kneussel, Hamburg

GENERALSEKRETÄR

Christian Steinhäuser, Bonn

Neuropharmakologie/-toxikologie

Angelika Richter, Leipzig

SCHATZMEISTER

Ansgar Büschges, Köln

Systemneurobiologie

Benedikt Grothe, Martinsried

SEKTIONSPRECHER

Computational Neuroscience

Stefan Rotter, Freiburg

Verhaltensneurowissenschaften

Christian Wegener, Würzburg

Entwicklungsneurobiologie/Neurogenetik

Petra Wahle, Bochum

Zelluläre Neurowissenschaften

Christine R. Rose, Düsseldorf

Klinische Neurowissenschaften

Ricarda Diem, Heidelberg

Inhalt

Übersichtsartikel

Simone B. Sartori und Nicolas Singewald
Neue pharmakologische Strategien zur Augmentation von Extinktionslernen in der Angsttherapie — 197

Simone B. Sartori and Nicolas Singewald
New pharmacological strategies for augmenting extinction learning in anxiety disorders — A145

Viola Nordström und Silke Herzer
Veränderung von Membranlipiden schützt vor neuronaler Insulinresistenz in Alzheimer-Modellen — 212

Viola Nordström and Silke Herzer
Modification of membrane lipids protects neurons against insulin resistance in models of Alzheimer's disease — A157

Jens Rettig und David R. Stevens
Synaptische Transmission im Immunsystem — 223

Jens Rettig and David R. Stevens
Synaptic Transmission in the Immune System — A167

Tim Czopka und Franziska Auer
Neue Ansätze zur Analyse von Axon-Oligodendrozyten Kommunikation *in vivo* — 231

Tim Czopka and Franziska Auer
New Approaches to Analyse Axon-Oligodendrocyte Communication *in vivo* — A175

Olga Garaschuk
Altersbedingte Veränderungen der Mikrogliazellen: ihre Rolle bei gesundem Altern des Gehirns und bei neurodegenerativen Erkrankungen — 239

Olga Garaschuk
Age-related changes in microglial physiology: the role for healthy brain ageing and neurodegenerative disorders — A182

Institutsvorstellungen

Ute Habel und Ruben C. Gur
DFG-Graduiertenkolleg 2150 – „Neuronale Grundlagen der Modulation von Aggression und Impulsivität im Rahmen von Psychopathologie“ — 249

Dr. Jan Nissen, Dr. Ruth Narmann und PD Dr. Andreas Clausing
Leopoldina fördert die neurowissenschaftliche Kooperation auf internationaler Ebene — 256

Rezension

Steve Ayan
Rätsel Mensch – Expeditionen im Grenzbereich von Philosophie und Hirnforschung — 259

Nachruf

Thomas Deller, Robert Nitsch und Gaby Rune
Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Frotscher — 261

Nachrichten

Hans-Joachim Pflüger
Göttinger Jahrestagung 2017 – bewährt und beliebt — 265

Stipendien für das FENS Forum 2018 — 268

Kursprogramm 2018 der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e. V. — 269

Neueintritte — 270

Ausblick — 271

Übersichtsartikel

Simone B. Sartori und Nicolas Singewald*

Neue pharmakologische Strategien zur Augmentation von Extinktionslernen in der Angsttherapie

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-0011>

Zusammenfassung: Trotz Fortschritten in der Behandlung von Angst-, Trauma- und belastungsbezogenen Störungen ist der langfristige therapeutische Erfolg bei einem beträchtlichen Teil der Patienten noch immer unzureichend. Eine Option zur Therapieweiterentwicklung besteht in der pharmakologischen Optimierung der expositions-basierten Verhaltenstherapie. Ziel ist die Augmentation der Furchtextinktion, dem zentralen Mechanismus der Expositionstherapie, mittels Neuroenhancer und anderen Substanzen. Aufbauend auf Erkenntnissen aus Tier- und Humanstudien über die an erfolgreicher Furchtextinktion beteiligten neuronalen Schaltkreise und neurobiologischen Mechanismen konnten verschiedene pharmakologische Angriffspunkte identifiziert werden, über die Extinktion verbessert und auch gestörte Furchtextinktionsprozesse normalisiert werden können. Wir präsentieren anhand ausgewählter Beispiele u. a. translationale Evidenz, furchtinhibitorisches Extinktionslernen durch L-DOPA und D-Cycloserin zu verstärken, und diskutieren das Potenzial von HDAC-Inhibitoren und microRNAs als Modulatoren mit epigenetischen Angriffspunkten, sowie von Neuropeptid S als Modellschubstanz mit kombinierten akut anxiolytischen und extinktionsfördernden Eigenschaften. Die hier präsentierten Mechanismen stellen vielversprechende neue Ansätze zur Verbesserung der Effizienz und Akzeptanz von Expositionstherapien dar mit dem Ziel, pathologische Angstsymptomatik langfristig kontrollierbar zu machen. Sie stehen stellvertretend für

weitere entdeckte, vom Konzept her ähnliche Substanzen jedoch mit anderen pharmakologischen Angriffspunkten.

Schlüsselwörter: Furchtextinktion; Cognitive enhancer; L-DOPA; Neuropeptid S; D-Cycloserin

Einleitung

Bei einer Lebenszeitprävalenz von 20 bis zu 30% leben ca. 62 Mio. Personen in Europa mit der Diagnose einer Angst-, Trauma- oder belastungsbezogenen Störung (Wittchen et al., 2011; Bandelow und Michaelis, 2015). Ihnen gemeinsam ist das Empfinden und Auftreten von unangemessener Furcht, Angstzuständen, Vermeidungsverhalten und Stressreaktionen vielfach ausgelöst durch bestimmte Schlüsselreize – diese können Objekte, Situationen und andere extrinsische, aber auch intrinsische Stimuli sein. Häufig spielen dabei erlernte Verhaltensmuster z. B. im Zuge von Konditionierungen eine Rolle, wobei die beteiligten Assoziationen von konditionierten Stimuli (CS) und unkonditionierten Stimuli (US) (siehe Exkurs 1) oft nicht bewusst sind. Aufgrund eines oftmals frühen Krankheitsbeginns leiden Patienten Jahre, manchmal Jahrzehnte an ihrer Angststörung. Viele dieser Störungen sind verbunden mit einer relativ hohen Rückfallwahrscheinlichkeit und verschiedenen Begleiterkrankungen, wie Depression und Suchterkrankungen. Neben der verminderten Lebensqualität und dem Leidensdruck der Betroffenen und ihres sozialen Umfelds sind die volkswirtschaftlichen Ausgaben für medizinische Behandlungen, für Folgekosten, insbesondere die indirekten Kosten für Krankenstände, Frühpensionierungen, verminderte Produktivität am Arbeitsplatz etc. beträchtlich. Kosten für Therapien stehen jedoch etwa dem vierfachen Gewinn durch geleistete Arbeit und Beiträgen am Bruttoinlandsprodukt der Patienten gegenüber (Chisholm et al., 2016).

Die derzeit etablierten Therapien von Angststörungen beinhalten psychotherapeutische und pharmakologische Interventionen und deren Kombination, die darauf

***Korrespondenzautor:** Nicolas Singewald, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Zentrum für Molekulare Biowissenschaften Innsbruck (CMBI), Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Innrain 80–82, A-6020 Innsbruck, Austria, E-Mail: nicolas.singewald@uibk.ac.at

Simone B. Sartori, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Zentrum für Molekulare Biowissenschaften Innsbruck (CMBI), Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Innrain 80–82, A-6020 Innsbruck, Austria, E-Mail: simone.sartori@uibk.ac.at

abzielen, die Ausprägung der auftretenden Symptome zu dämpfen und die erlernte Furcht zu inhibieren (siehe Exkurs 1). Im Idealfall werden Patienten dazu von Psychiatern und Psychotherapeuten betreut. In der medikamentösen Langzeitbehandlung kommen überwiegend Antidepressiva wie Selektive Serotonin- (SSRIs) und/oder Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer zum Einsatz. Diese vermögen die Furchtreaktion und Angstsymptomatik zu vermindern und den Antrieb/Motivation den individuellen Anforderungen entsprechend zu modulieren. In der akuten Angstphase können zur Dämpfung der Symptome vorübergehend Anxiolytika wie Benzodiazepine (z. B. Lorazepam, Alprazolam) verabreicht werden – eine Langzeitbehandlung ist aufgrund ihres Abhängigkeitspotenzials nicht empfohlen. Neben der Medikation gibt es eine Reihe psychotherapeutischer Interventionen, die u. a. darauf ausgerichtet sind, die bei Angsterkrankungen oft mangelhaften, furchtinhibitorischen Mechanismen zu stärken und zu lernen, die Angstsymptomatik besser zu kontrollieren. Besonders wichtig für die verhaltenstherapeutische Behandlung ist die Expositionstherapie. Dabei wird der Patient wiederholt mit angstbesetzten Reizen und Erinnerungen konfrontiert (daher auch als Konfrontationstherapie bezeichnet). Durch die dabei gemachten Erfahrungen, dass die erwartete Gefahr/unerträgliche Situation nicht oder nicht in dem erwarteten Ausmaß eintritt (Kontingenzerwartung, „*prediction error*“), wird neues Lernen initiiert, die angstbesetzte Situation neu bewertet, und die antizipatorische Furchtreaktion und Vermeidungsverhalten reduziert (siehe Exkurs 1). Extinktion als zentraler Mechanismus der Expositionstherapie beinhaltet ein aktives, neues inhibitorisches Assoziationslernen, während (vor allem bei der prolongierten Exposition) ebenfalls beteiligte Habituationsmechanismen nicht assoziativer Natur sind. Die neu enkodierten Gedächtnisspuren für „CS-kein US“ (Sicherheit) unterdrücken die verhaltensmäßige Ausprägung der noch weiter bestehenden (Furcht)-Gedächtnisspuren. Daran sind implizite und je nach Ausmaß der kognitiven Anleitung des Therapeuten auch explizite Gedächtnisinhalte beteiligt.

Trotz guter Erfolge ist die Expositionstherapie nicht bei allen Patienten effektiv. So zeigt sich bei bis zu 40% der Patientengruppe, die die Therapie auch abschloss, kein klinisch relevanter Behandlungserfolg (Bandelow und Michaelis, 2015). Selbst nach einer zunächst erfolgreichen Expositionstherapie ist die Rückfallquote relativ hoch, was u. a. darauf zurückzuführen ist, dass das initiale Furchtgedächtnis durch Extinktion nicht gelöscht wird. Dadurch kann durch bestimmte Auslöser/Umstände die ursprüngliche Furchtgedächtnisspur reaktiviert und die Furchtreaktion wieder ausgelöst werden: i) durch

längeren zeitlichen Abstand nach Beendigung der letzten Expositionssitzung (Spontanerholung der Furchtreaktion, „*spontaneous recovery*“), ii) durch Konfrontation mit dem angstbesetzten Stimulus in einem anderen Kontext, außerhalb der „sicheren Therapieumgebung“ (kontextabhängige Erneuerung der Furchtreaktion, „*renewal*“) oder iii) durch Wiederbeleben der Furchtassoziation nach Erleben aversiver Stimuli wie dem ursprünglichen Furchtreiz oder allgemeinen starken stressbelasteten Ereignissen (Wiedereinsetzen der Furchtreaktion, „*reinstatement*“). Ein weiterer möglicher Nachteil der Therapie ist die auftretende subjektiv unerträgliche psychische Belastung, vor der ein beträchtlicher Anteil der Patienten zurückschreckt („Angst vor der Angst“).

Mit verschiedenen, in den letzten Jahren neu entwickelten Ansätzen will man nun die Effektivität der Expositionstherapie verbessern und auftretende Belastungen vermindern. Der aktuelle Forschungsfokus liegt auf einer deutlichen Förderung des inhibitorischen Lernens während der Therapiesitzung (Extinktionstraining) und der Konsolidierung in ein Extinktionsgedächtnis (siehe Exkurs 1). Nicht-pharmakologische Optimierungsansätze reichen von der „Dosierung“ und/oder variablen Gestaltung der Exposition, über dem Widerlegen der angstbezogenen Erwartungen, dem Entfernen von Sicherheitssignalen (Pittig et al., 2016) bis zur Nutzung von Konsolidierungsmechanismen im Schlaf. Die Hoffnung, durch Kombination mit aktuell verwendeter Angstmedikation (Anxiolytika) synergistische Therapieeffekte zu erzielen und gleichzeitig auch die psychische Belastung vor der Exposition abzuschwächen, wurden bisher nicht erfüllt (Hofmann et al., 2009; Otto et al., 2010). Alternative pharmakologische Ansätze zielen deshalb auf Substanzen ab, die den neuen Lernprozess initiieren helfen und die Bildung eines furchtinhibierenden Extinktionsgedächtnisses (z. B. Neuroenhancer) fördern, indem sie theoretisch auf Mechanismen wie Aufmerksamkeit, Motivation, Encodierung u. a. einwirken könnten, vor allem aber die Konsolidierung des Extinktionsgedächtnisses in eine Langzeiterinnerung stärken sollen. Dies geschieht durch Interaktion mit Signalkaskaden in Hirnregionen und Schaltkreisen, die für Extinktionsprozesse wichtig sind (Exkurs 2). Obwohl das Erleben der Angst während der Exposition für den therapeutischen Lerneffekt eine wichtige Komponente sein könnte, versucht man auch Substanzen mit akut angstlösender Wirkung ohne gedächtnisbehindernder Sedierung zu entwickeln. Derzeit erfüllt kein in der Angsttherapie zugelassenes Medikament alle diese Anforderungen [Übersicht in (Singewald et al., 2015)].

Wir stellen hier eine Auswahl von Arzneistoffen und Modellsubstanzen vor, die basierend auf fortschreiten-

den Kenntnissen aus Tier- und Humanstudien (Milad und Quirk, 2012) über die der Extinktion zugrunde liegenden neuronalen Schaltkreise und Mechanismen (Exkurs 2) entwickelt wurden. Diese stehen stellvertretend für hier nicht weiter erwähnte Substanzen mit vergleichbaren, jedoch über andere primäre Mechanismen erreichbare Wirkungen wie z. B. Glukokortikoide, Yohimbin, Neuropeptide wie Neuropeptid Y, Opioide und Oxytozin, Wachstumsfaktoren wie BDNF und Fibroblast-Wachstumsfaktor-2, Cannabinoide, mGLUR7 Rezeptoren [Übersicht in (Graham et al., 2011; Singewald et al., 2015)]. Sie fördern Mechanismen zum Erwerb und/oder Konsolidierung des Extinktionsgedächtnisses (Exkurs 1) und werden z. T. bereits klinisch getestet. Es sind dies Beispiele, die in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung stehen (von sehr frühen Stadien bei Testungen an Nagern bis zu klinischen Phase II – Studien) und zu deren Erkenntnisgewinn auch unsere Arbeitsgruppe zusammen mit Kollaborationspartnern beigetragen haben: L-DOPA und vor allem D-Cycloserin (DCS) als Beispiele für Substanzen, die bereits für andere Indikationen zugelassen und am weitesten in ihrer Entwicklung sind, sowie die in sehr frühen Entwicklungsstadien stehenden HDAC-Inhibitoren und microRNAs als

Beispiele epigenetischer Angriffspunkte, sowie Neuropeptid S (NPS) als Modellsubstanz für kombiniert akut anxiolytischen und extinktionsfördernden Eigenschaften. Da eine einmalige Applikation der Substanzen zeitnah zur Expositionssitzung erfolgen soll, werden im Vergleich zu chronischen Verabreichungen weniger Nebenwirkungen und bessere Compliance der Patienten erwartet.

D-Cycloserin: eine translationale Erfolgsgeschichte

Basierend auf tierexperimentellen Studien, die zeigen, dass die Aktivierung glutamaterger N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA) Rezeptoren maßgeblich am Furcht-Extinktionslernen beteiligt ist, wurde im Jahr 2002 erstmalig von der extinktionsunterstützenden Wirkung des partiellen NMDA-Rezeptor – Agonisten DCS berichtet [Übersicht in (Otto et al., 2016)]. DCS bindet direkt an Glycin-sensitive NMDA-Rezeptoren in extinktionsrelevanten Hirngebieten wie z. B. der Amygdala (Exkurs 2) und fördert einen wichtigen, der Gedächtnisbildung zugrunde liegenden



F · S · T[®]

FINE SCIENCE TOOLS

**UNSER NEUER
KATALOG 2018
IST DA!**

JETZT ANFORDERN UNTER:
TELEFON 06221 905050
ODER FINESCENCE.DE

FINE SURGICAL INSTRUMENTS
FOR RESEARCH[™]

molekularen Mechanismus, die Langzeitpotenzierung (LTP). Weitere präklinische Studien in verschiedenen Spezies bestätigten die positiven Wirkungen von DCS zur Förderung des Extinktionslernens und vor allem der Konsolidierung dieser Gedächtnisinhalte [z. B. (Sartori et al., 2016), Übersicht in (Singewald et al., 2015)]. Da DCS ein seit Langem zur Behandlung von Tuberkulose zugelassener Arzneistoff ist, wurden bereits zwei Jahre später erste vielversprechende Daten von K. Ressler und Mitarbeitern über die Kombination von DCS mit Verhaltenstherapie in Patienten mit Höhenphobie veröffentlicht, denen Studien in Patienten mit spezifischen Phobien, Panikstörungen, Zwangsstörungen und posttraumatischen Belastungsstörungen folgten. In den ersten Untersuchungen zeigte sich, dass die Expositionstherapie bestimmter Angststörungen deutlich effektiver mit dem Zusatz von DCS verlief. Es folgten jedoch widersprüchliche Ergebnisse, sodass verschiedene Metaanalysen kein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich einer extinktionsfördernden Wirkung von DCS zeigten [Übersicht in (Otto et al., 2016)]. Das könnte neben der Heterogenität der untersuchten Störungen und Begleitmedikationen (z. B. SSRIs) auch damit zusammenhängen, dass man der Möglichkeit zusätzlicher Wirkungen von DCS zu wenig Beachtung geschenkt hatte. Inzwischen weiß man, dass es bei Expositionssitzungen, bei denen sich keine Furchtreduktion (entsprechend dem habituationsbasierten Modell der Extinktion) zeigt, zu einer Förderung der Rekonsolidierung des Furchtgedächtnisses kommen kann [Übersicht in (Otto et al., 2016)]. Dementsprechend schlagen aktuelle Empfehlungen eine Verabreichung von DCS ausschließlich *direkt nach* „*erfolgreicher*“ Expositionssitzung in einer kontrollierten, stressfreien Umgebung vor. Dies scheint auch für andere gedächtnisfördernde, pharmakologische Interventionen zu gelten (siehe unten und Exkurs 1). Wenn DCS so ein- bis wenige Male in niedriger Dosis in einem befristeten Zeitraum gezielt verabreicht wird, kann es den Therapieerfolg von Expositionssitzungen erhöhen [Übersicht in (Otto et al., 2016)]. Zahlreiche derzeit angemeldete Studien mit verschiedenen Patientengruppen (siehe <https://clinicaltrials.gov/>) sollen dies weiter abklären.

L-DOPA

Der Neurotransmitter Dopamin gehört zur Gruppe der Katecholamine und kommt verbreitet im Gehirn vor. Für Extinktionsprozesse potenziell wichtige dopaminerge Projektionen ziehen vom ventralen Tegmentum zum medialen präfrontalen Kortex (mPFC), Hippocampus und zur

Amygdala, die Schlüsselfunktionen bei der Prozessierung der Furchtextinktion einnehmen (siehe Exkurs 2), sowie zum Nucleus accumbens [Übersicht in (Abraham et al., 2014)]. Während und nach einer erfolgreichen Extinktionssitzung ist die Dopaminfreisetzung im mPFC gesteigert [Übersicht und Originalliteratur in (Singewald et al., 2015)] und wichtige Marker dopaminerge Signalwege in der Amygdala werden hochreguliert (Whittle et al., 2016). In einer translationalen Studie zeigten die Arbeitsgruppen von R. Kalisch und H.C. Pape zusammen mit uns auf, dass die Verabreichung von L-DOPA, einer Biovorstufe von Dopamin, das Extinktionsgedächtnis in nicht-extinktionsgestörten Mäusen und Menschen weiter fördert und das Rückfallrisiko von Furchtreaktionen in beiden Spezies deutlich senkt (Haaker et al., 2013). Zudem konnten wir vor Kurzem extinktionsauslösende Wirkungen einer Einmaldosis von L-DOPA erstmals auch in einem klinisch relevanten Mausmodell defizitärer Extinktion nachweisen [(Whittle et al., 2016), siehe Exkurs 1]. Es bleibt abzuwarten, ob diese vielversprechenden Ergebnisse in der klinischen Testung auch auf Angstpatienten übertragen werden können. Nachdem L-DOPA ein bereits zugelassener Arzneistoff für die Behandlung von Morbus Parkinson ist, ist seine überwachte, einmalige Gabe vor bzw. nach einer begrenzten Zahl von Expositionssitzungen als sehr sicher anzusehen, was die Genehmigung der Durchführung von entsprechenden klinischen Studien erleichtert. Untermuert wird dies zudem durch die beschriebene, verbesserte und langandauernde Wirkung der Expositionstherapie in einer kleinen Gruppe von behandlungsresistenten Patienten mit posttraumatischer Belastungsstörung nach Kombination mit MDMA (3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin; „Ecstasy“), wodurch dopaminerge (neben serotonergen und anderen Transmittern) Signalwege aktiviert werden [Übersicht in (Singewald et al., 2015)].

Die extinktionsverbessernden Mechanismen von L-DOPA sind wenig geklärt, dürften aber u. a. über Verbesserung der Konsolidierung des neuen Extinktionslernprozesses und die Modulation der Furchtexpression mediiert werden [Übersicht in (Abraham et al., 2014; Singewald et al., 2015)]. Möglicherweise beeinflusst die Förderung dopaminerge Signalwege auch Motivation, Kontingenzerwartung, die Salienz des angstbesetzten Stimulus während des Extinktionslernens oder auch kontextuelle Informationsprozessierung [(Andre und Manahan-Vaughan, 2015; Lissek et al., 2015), Übersicht in (Abraham et al., 2014)]. Neben den potenziell beteiligten Hirngebieten (siehe Exkurs 2) ist zu klären, welche(r) Dopaminrezeptor(en) die extinktionsfördernden Wirkungen von L-DOPA vermitteln. Dopamin aktiviert fünf metabotrope Rezeptoren, die vornehmlich entweder an stimulierende G_s oder G_q , Protein

(D1-artige Rezeptoren) oder an ein inhibierendes $G_{i/o}$ -Protein (D2-artige Rezeptoren) gekoppelt sind, jedoch auch weitere Signalwege nutzen [Übersicht in (Abraham et al., 2014)]. Soweit bekannt, kontrollieren D1- und D2-artige Rezeptoren in einem feinabgestimmten Zusammenspiel die neuronale Aktivität in der Amygdala und im mPFC (siehe Exkurs 2). Tatsächlich verbessert die Aktivierung von D1-Rezeptoren im mPFC die Konsolidierung der Furchtextinktion (eventuell via Interaktion mit exzitatorischen NMDA-Rezeptoren und LTP-abhängigen Mechanismen), wobei eine D5-Rezeptor-vermittelte Komponente aufgrund der mäßigen Selektivität der verfügbaren Liganden nicht vollständig ausgeschlossen werden kann [Übersicht in (Abraham et al., 2014; Singewald et al., 2015)]. Nachdem jedoch neueste Daten (mit einer allerdings konventionell genetisch veränderten Mauslinie) unter Umgehung dieses Selektivitätsproblems darauf hinweisen, dass D1-Rezeptoren weniger als bisher angenommen an bestimmten Formen des Assoziationslernens beteiligt sind (Abraham et al., 2016), erscheint es nun naheliegend, die Rolle der anderen Dopaminrezeptoren bei Furchtextinktion verstärkt ins Auge zu fassen, zumal Dopamin mit höherer Affinität an diese als an D1-Rezeptoren bindet.

Neuropeptid S

Ein weiteres zu verbesserndes Therapieproblem ist, dass ca. 30% der Patienten die Teilnahme an einer Expositionstherapie verweigern, aufgrund der erwarteten (unerträglichen) Angst-/Stressreaktion während der Konfrontation mit dem furchtauslösenden Stimulus. Die Verabreichung akut angstlösender Substanzen wie Benzodiazepinen vor der Expositionstherapie könnte hierbei hilfreich sein. Es zeigte sich jedoch, dass Benzodiazepine zwar die auftretende Angst dämpfen und dadurch vielfach die Exposition erst ermöglichen, aber durch ihre sedative Wirkung Extinktionsprozesse stören, sowie sogar eine Art „interozeptiven Zustand“ hervorrufen, der auch ein zustandsabhängiges Lernen auslöst. Insgesamt wurde dadurch die Effizienz der Expositionstherapie eher vermindert [Übersicht in (Otto et al., 2010)]. Ebenso sind für diesen Zweck Psychostimulantien wie z. B. Amphetamine, die Vigilanz und z. T. die Aufmerksamkeit steigern, aufgrund ihrer fehlenden anxiolytischen Wirkung nicht geeignet. Gesucht werden daher in diesem Zusammenhang Substanzen, die sowohl angstlösende als auch Lernprozess-fördernde Eigenschaften aufweisen.

FiberOptoMeter II

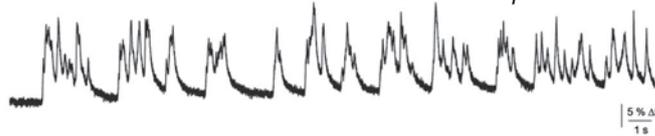
FOM-02M/FOM-02D

Optogenetic Stimulation and Fluorescence Measurement *via* the Same Fiber
Now available with 2 Detectors and Exchangeable Filter Cubes

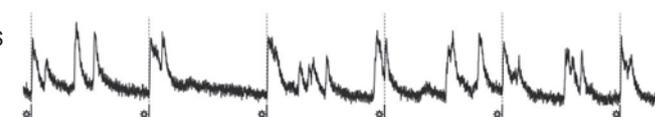


OGB-1 Fluorescence Measurement *via* a 200 μm Fiber

Slow calcium waves, spontaneous activity



Same measurement as above, evoked (*) and spontaneous slow calcium waves



Data kindly provided by
 Dr. A. Stroh and M. Schwalm, Mainz



npi
 Electronic Instruments
 for the Life Sciences

made to measure

npi electronic GmbH

Phone: +49-(0)7141-97302-30
<http://www.npielectronic.com>
support@npielectronic.com

REF: **Justus et al.** (2016), Nat. Neurosci. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4447>

Adelsberger et al. (2014), Cold Spring Harb Protoc. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot0845>

Stroh et al. (2013) Neuron, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.031>

Einige Studien weisen darauf hin, dass das aus 20 Aminosäuren bestehende NPS diesen Anforderungen als Modells substanz gerecht werden könnte. Die Expression von NPS im Gehirn ist im Verhältnis zu anderen Neuro-Modulatoren limitiert, der NPS-Rezeptor kommt jedoch in jenen Teilen des Gehirns von Nagern vor, in denen Extinktion prozessiert wird (siehe Exkurs 2). In tierexperimentellen Studien wurden die speziellen pharmakologischen Wirkungen von NPS aufgedeckt, nämlich gleichzeitig anxiolytisch, antriebs- bzw. aufmerksamkeitssteigernd und zusätzlich noch Extinktionsgedächtnisfördernd zu sein [(Jungling et al., 2008; Slattery et al., 2015); Übersicht in (Reinscheid et al., 2005)]. Zudem kann NPS Extinktionslernen auch in völlig extinktionsdefizitären Nagern initiieren, wobei bereits zu Beginn des Extinktionstrainings eine anxiolytische/furchtinhibitorische Wirkung beobachtet wird (Sartori et al., 2016). Mechanismen dieser Wirkungen von NPS wurden bisher im Gehirn von Nagern untersucht und führen dort u. a. vermutlich über eine Stimulation von hochspezifischen inhibitorischen Interneuronen, den sogenannten interkalierten Zellen (ITCs) zu einer Dämpfung der Aktivität der Furcht-output – Neurone in der zentromedialen Amygdala [siehe Exkurs 2; Übersicht in (Pape und Wotjak, 2013)]. Zusätzlich scheint NPS weitere extinktionsrelevante Neurotransmittersysteme einschließlich Dopamin im mPFC und Hippocampus zu modulieren. In wieweit diese Daten von Nagern auf den Menschen übertragen werden können, ist im Moment u. a. auch aufgrund fehlender Informationen über die genaue Verteilung des NPS Systems im Menschen unklar, jedoch sollten bereits erste bekannte speziesspezifische Unterschiede bei der Entwicklung des NPS-Systems als potenzielles pharmakologisches Angriffsziel berücksichtigt werden (Adori et al., 2015). Interessanterweise wurden Polymorphismen im NPS-Rezeptor, die dessen Funktion verändern, mit einer erhöhten Inzidenz für Panikstörungen (Domschke et al., 2011) in Zusammenhang gebracht, was die Bedeutung als hoffnungsvolles Target unterstreicht.

Ungeachtet der vielversprechenden präklinischen Ergebnisse ist jedoch eine Begleittherapie mit NPS zur Expositionstherapie von Patienten in naher Zukunft vor allem deshalb unwahrscheinlich, weil aktuell kein hirngängiger NPS-Rezeptor – Agonist bzw. auch kein funktionell-selektiver Agonist („biased agonist“) mit potenziell verbessertem Nebenwirkungsprofil verfügbar ist (Clark et al., 2017). Während die Entwicklung solcher nicht-Peptid NPS-Rezeptor-Agonisten intensiv verfolgt wird, könnte auch die Applikation von NPS über die Nasenschleimhaut eine mögliche nicht-invasive Verabreichungsmethode darstellen, die bereits für andere Neuropeptide wie z. B. Oxytozin eingesetzt wird. Dieser Ansatz wird durch erste

Erfolge in Mäusen unterstützt, die zeigen, dass bereits 30 Minuten nach intranasaler Applikation geringe Mengen an NPS das Gehirn erreichen, dort an NPS-Rezeptoren binden und anxiolytische Wirkungen auslösen (Ionescu et al., 2012; Lukas und Neumann, 2012).

Epigenetische Mechanismen

Die Bildung eines Extinktionsgedächtnisses beinhaltet ein Zusammenspiel aus zielgerechter Signaltransduktion, Genexpression und Translation spezifischer Proteine, die für Lern- und Gedächtnis-assoziierte Mechanismen einschließlich synaptischer Plastizität wichtig sind. Die Aktivität von Genen bzw. die Genexpression wird über verschiedene epigenetische Mechanismen reguliert. Beim Extinktionslernen sind neben Regulationsmechanismen, wie die microRNAs miR128b (Lin et al., 2011) oder miR144 [(Murphy et al., 2017); Übersicht in (Singewald et al., 2015)], auch Modifikationen von DNA und DNA-assoziierten Proteinen, den Histonen, von Bedeutung. Insbesondere scheint vor allem das Ausmaß der Histonazetylierung bei Extinktionsprozessen wichtig zu sein. Histonazetyltransferasen übertragen Azetylreste auf die Lysin-Aminosäuren an N-terminalen Enden von Histonproteinen und fördern u. a. durch die damit verbundene Auflockerung des Chromatins die Genexpression, während Histondeazetylasen (HDAC) Azetylgruppen von Lysinen entfernen und so die Gentranskription behindern. Die Feinabstimmung von Azetylierung und Deazetylierung von Histonen während und nach dem Extinktionstraining bestimmt letztendlich, ob und wie ausgeprägt die für die Entstehung eines stabilen Extinktionsgedächtnisses wesentliche Genexpression und nachgeschaltete Prozesse stattfinden. Obwohl unsere Kenntnisse über involvierte Substrate derzeit noch limitiert sind, scheint die vermehrte Azetylierung in der Promoterregion des Wachstumsfaktors BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), bestimmter NMDA-Rezeptoren Untereinheiten (z. B. *grin2b*), der Neuroplastizitäts-assoziierten *Immediate Early Genes* einschließlich *c-fos* und *arc* sowie dopaminergener Gene (Whittle et al., 2016) eine wesentliche Rolle bei der Extinktionskonsolidierung zu spielen [Übersicht in (Singewald et al., 2015)].

Histonazetylierung kann pharmakologisch durch HDAC-Inhibitoren gesteigert werden. Die Verabreichung verschiedener HDAC-Inhibitoren begleitend zur Extinktion wurde in Tierstudien untersucht. Trichostatin A, Natriumbutyrat, Entinostat (MS-275), Vorinostat (SAHA), Valproat (VPA) und CI-944 zeigen alle furchtextinktionssteigernde Wirkung [Übersicht in (Singewald et al., 2015)].

Durch CI944, MS-275 und SAHA konnten auch Extinktionsdefizite in verschiedenen Tiermodellen aufgehoben werden, was auf ein mögliches klinisches Potenzial dieser Substanzen hinweist. Wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte, war die durch MS-275 verbesserte Furchtextinktion in extinktionsdefizitären Mäusen von einer erhöhten Histon H4 Azetylierung in extinktionsrelevanten Hirngebieten begleitet (Whittle et al., 2016). Die bisher getesteten Substanzen sind unspezifische HDAC-Inhibitoren und inhibieren mehrere HDAC Isoformen, präferenziell jene der Klasse 1, zu denen HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 zählen. Mithilfe genetisch veränderter Mauslinien wurden erste Hinweise erhalten, dass durch Gen-Silencing der HDAC2, nicht aber HDAC1 im Vorderhirn die Furchtextinktion verbessert wird [Originalliteratur und Übersicht in (Singewald et al., 2015)]. Die Entwicklung von spezifischen HDAC-Inhibitoren zur Reduktion potenzieller Nebenwirkungen und auch Effektivitätssteigerung wird derzeit vorangetrieben.

Konzept einer Dualpharmakotherapie begleitend zur Expositionstherapie

In extinktionsdefizitären Individuen, wie sie Angstpatienten oftmals darstellen (siehe Exkurs 1), reicht die Verabreichung eines einzelnen Arzneistoffs begleitend zur Furchtextinktion in vielen Fällen nicht aus, um extinktionsgedächtnissteigernde Mechanismen so zu stärken, dass zeitliche, räumliche oder stressabhängige Furchtrezidive verhindert werden können [Übersicht in (Singewald et al., 2015)]. Überdies weist aktuell kein hirngängiger Arzneistoff neben gedächtnisfördernden auch akut anxiolytische zusammen mit nicht-sedierenden Wirkungen auf, wodurch eine Kombination geeigneter Substanzen anzudenken ist. So konnte erstmals in extinktionsdefizitären Mäusen gezeigt werden, dass nur die kombinierte Applikation von NPS vor und DCS nach erfolgreichem Extinktionstraining, nicht aber von NPS alleine, zu einem robusten Extinktionsgedächtnis führt, das den unterschiedlichen Arten der Furchtrückkehr standhält (Sartori et al., 2016). In Anlehnung an dieses dualpharmakotherapeutische Konzept werden Furchtrezidive in extinktionsdefizitären Mäusen auch durch die Kombination von L-DOPA mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 begleitend zum Extinktionstraining reduziert (Whittle et al., 2016).

Zusammenfassung und Ausblick

Wir geben hier eine Auswahl möglicher pharmakologischer Strategien zur Stärkung von Extinktionsprozessen im Zuge von Expositionssitzungen. Ziele dieser Strategien sind verbesserte Erfolge der Expositionstherapie hinsichtlich Effizienz, Langzeiterfolg und Akzeptanz. Basierend auf der Erweiterung unseres Wissens über extinktionsrelevante Schaltkreise und biologische Mechanismen [siehe Exkurs 2; Übersicht in (Milad und Quirk, 2012)], die bei Patienten mit Angst-, Trauma- oder belastungsbezogenen Störungen oft gestört sind, ist eine rationale Anwendung bestimmter Substanzen an validierten Tiermodellen sowie bereits an gesunden Probanden und an geeigneten Patientengruppen untersucht worden (siehe Exkurs 3). Mit diesen Kenntnissen war es auch möglich, neuartige (z. B. NPS) und hier nicht näher diskutierte pharmakologische Angriffspunkte wie z. B. Glukokortikoide, Yohimbin, Neuropeptide wie Neuropeptid Y, Opiode und Oxytozin, Wachstumsfaktoren (BDNF und Fibroblast-Wachstumsfaktor-2), Cannabinoide, mGLUR7 Rezeptoren, die z. T. noch sehr am Beginn der Entwicklung stehen, aber auch nicht-pharmakologische Strategien wie Tiefenhirnstimulation im Nucleus Accumbens abzuleiten [Übersicht in (Graham et al., 2011; Singewald et al., 2015)].

Der gezielte Einsatz von solchen potenziell gedächtnisfördernden Substanzen in engem zeitlichen Zusammenhang mit erfolgreichem Extinktionstraining hat in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit erhalten. Die Entwicklung von DCS spiegelt beispielhaft gelungene, translationale Forschung vom Tierexperiment bis zur Anwendung am Patienten wider, der hoffentlich weitere Substanzen wie z. B. L-DOPA demnächst folgen werden (Exkurs 1–3). Durch die tiereperimentelle und klinische Forschung wurde die pharmakotherapeutisch unterstützte Furchtextinktion weiter optimiert, um off-target Effekte, wie die mögliche Förderung der Rekonsolidierung der initialen Furchtgedächtnisspuren, zu vermeiden. Das Konzept eines dualpharmakotherapeutischen Ansatzes eröffnet neue Wege, um angstlösende mit gedächtnisfördernden Substanzen zu kombinieren und damit auch die psychische Belastung der Patienten vor und bei der Expositionstherapie zu vermindern.

Derzeit werden die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sowie das Zusammenspiel einzelner Hirngebiete und Schaltkreise für die Extinktionsförderung durch Neuroenhancer, epigenetische Modulatoren und andere Lern- und Gedächtnis modulierende Ansätze primär an Nagern studiert (siehe Exkurs 2) und müssen in Humanstudien bestätigt bzw. adaptiert werden. Die bereits gewonnenen und noch zu erzielenden Erkenntnisse wer-

den dazu beitragen, effektive pharmakologische Angriffspunkte abzuleiten, um psychotherapeutische Interventionen optimal zu verstärken und damit eine verbesserte und langwirksame Behandlung von Angst-, Trauma- und belastungsbezogenen Erkrankungen zu ermöglichen.

Danksagung: Wir danken dem FWF (Austrian Science Fund) für die finanzielle Unterstützung unserer hier beschriebenen Forschungsarbeiten, sowie Dr. Maria Kharitonova und Zeljko Stevic für die Unterstützung bei den Abbildungen.

Exkurs 1: Modulation der Extinktion als experimenteller Ansatz der Expositionstherapie

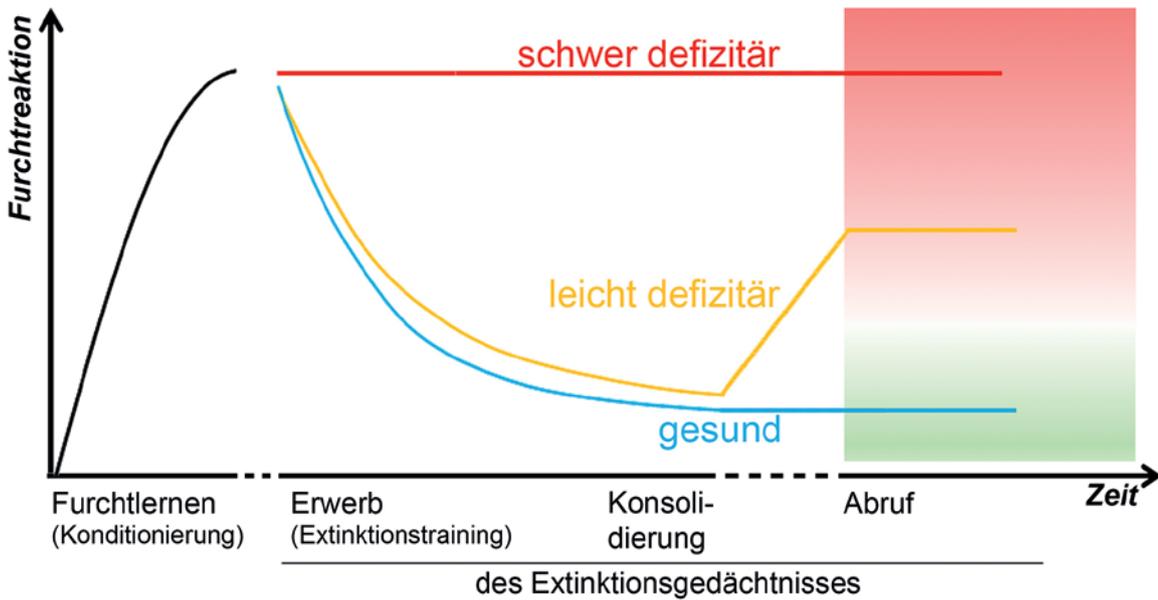
Extinktion konditionierter Angst als zentraler Mechanismus der Expositionstherapie basiert auf verschiedenen theoretischen Ansätzen, die sich in den letzten Jahrzehnten durch neue Forschungsergebnisse wesentlich weiterentwickelt haben. Neben dem experimentellen Ansatz (dem eigentlichen Extinktionstraining) und der Reduktion der konditionierten Reaktion selbst beschreibt Extinktion vor allem auch die neuronalen Lernprozesse, die dem aktiven Umlernen durch Sicherheitslernen und die Bildung eines neuen Inhibitionsgedächtnisses zugrunde liegen. **A.** Furchtlernen erfolgt durch (Pavlov'sche) Konditionierung und stellt das Lernmodell vieler Angststörungen dar. Dabei kommt es zu einer Verknüpfung des zuvor neutralen Konditionierungsstimulus (CS; z. B. quietschende Autoreifen im Verkehr, in experimentellen Versuchsanordnungen z. B. Ton, Licht oder Computerbild) mit dem aversiven unkonditionierten Stimulus [US; z. B. Autounfall, in experimentellen Studien z. B. ein milder Elektroschock an Hand, Finger (Mensch) oder Fuß (Tier)]. Schaltkreise in der Amygdala und anderen Regionen ermöglichen, dass Furcht erfahrungsabhängig erlernt und als Furchtgedächtnis gespeichert wird. Über Aktivierung dieser Gedächtnisspur löst der nun angstbesetzte CS unabhängig vom US eine antizipatorische Furchtreaktion aus, die sich u. a. in Änderungen der Hautleitfähigkeit, Herzfrequenz, Elektromyografie oder Verhalten widerspiegelt. Bei Angstpatienten ist diese Reaktion übersteigert, was u. a. auf Prozessierungsdefizite in cortico-limbischen Schaltkreisen des Furchtsystems im Gehirn beruht.

Während des Extinktionstrainings wird der CS ohne US üblicherweise in einem anderen Kontext wiederholt dargeboten. Es bildet sich eine neue, inhibitorische

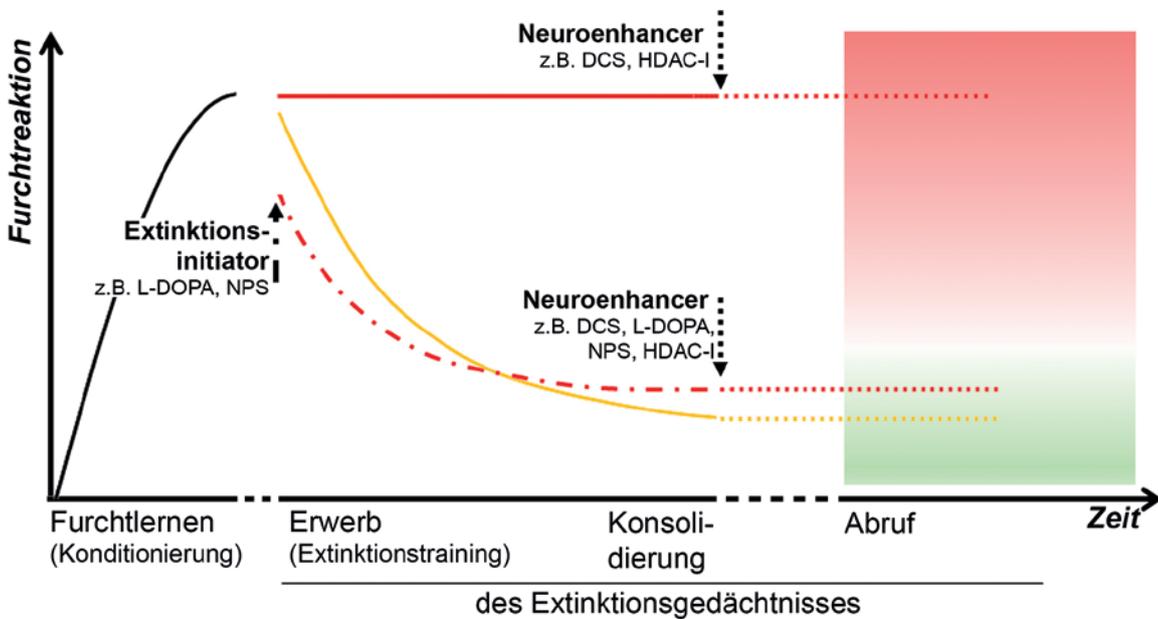
Assoziation, in der der angstbesetzte Reiz die aversive Konsequenz nicht länger vorhersagt „CS-kein US“ (siehe „Erwerb des Extinktionsgedächtnisses“), die konsolidiert wird. Diese existiert neben der ursprünglichen exzitatorischen „CS-US“ Assoziation, kann jederzeit abgerufen werden und hemmt jene. Die Furchtreaktion nimmt ab bzw. ist selbst lange nach dem Training erniedrigt (gesund/blaue Linie) und kann als kritischer Index für die erfolgte Konsolidierung des Extinktionslernens herangezogen werden. Patienten mit einer Angst- oder Trauma-assoziierten Störung weisen oft Defizite im inhibitorischen Lernen auf, wodurch die Furchtreaktion selbst nach zunächst erfolgreichem Extinktionstraining zurückkehrt (leicht defizitär; gelbe Kurve) oder kein initiales Extinktionslernen vorhanden ist (schwer defizitär; rote Kurve). **B.** Zur Optimierung expositionsbasierter Interventionen können Mechanismen des Extinktionslernens pharmakologisch gestärkt werden. Dazu stellen wir hier zwei Konzepte vor: 1. bei leicht defizitärer Extinktion mit initialem Extinktionslernen die Verabreichung *eines* gedächtnisfördernden Arzneistoffs (Neuroenhancer), idealerweise nach erfolgreichem Extinktionstraining (siehe Text) und 2. da bei schwer defizitärer Extinktion z. B. die hier vorgestellten, ausgewählten Beispiele DCS und HDAC-I keinen Effekt (Hefner et al., 2008; Sartori et al., 2016) zeigten, bedarf es hier der *Kombination* von Substanzen, die vor dem Training gegeben das Extinktionslernen ins Rollen bringen und eine graduelle Furchtreduktion ermöglichen (Extinktionsinitiator), und solchen, die nach dem Training gegeben Konsolidierungsmechanismen fördern (Neuroenhancer). Abkürzungen: DCS: D-Cycloserin; HDAC-I: Inhibitor der Histondeazetylase; NPS: Neuropeptid S.

Exkurs 1.

A. Verlauf der Furchtsymptomatik bei erfolgreicher und defizitärer Extinktion



B. Möglichkeiten der Arzneistoff-unterstützten Förderung der Extinktion



- ohne Zusatz von Pharmaka
- - - nach Gabe eines Extinktionsinitiators
- nach Gabe eines Neuroenhancers

Abb. 1: Exkurs 1: Modulation der Extinktion als experimenteller Ansatz der Expositionstherapie

Exkurs 2: Zentrale Schaltkreise der Furchtextinktion und pharmakologische Angriffspunkte zur Extinktionsförderung

Nach unserem derzeitigen Wissensstand sind am Aufbau einer kontextabhängigen, inhibitorischen „CS-kein US“ Gedächtnisspur in Folge von Extinktionslernen vor allem die Amygdala, der mediale präfrontale Kortex (mPFC) und Hippocampus (HPC) involviert, die wichtige Teile von Furchtschaltkreisen darstellen [Übersicht in (Pape und Wotjak, 2013)]. Selbst wenn Homologien zwischen Regionen und Schaltkreisen im Gehirn von Nagern und Menschen nicht immer eindeutig zu ziehen sind, ist die Funktion bestimmter Anteile furchtassoziierter neuronaler Netzwerke spezieübergreifend konserviert. So werden z. B. ähnliche Aktivitätsänderungen in Amygdala und Teilen des Kortex bei Furchtextinktion in Menschen wie in Nagern beobachtet (Milad und Quirk, 2012). Die ventral gelegene infralimbische Region (IL) des mPFC (human: ventromedialer präfrontaler Kortex, vmPFC) dient u. a. dem Abrufen des Extinktionsgedächtnisses und aktiviert in der basalen Amygdala (BA) exzitatorische Extinktionsneurone (grüne Symbole). Extinktionsneurone aktivieren hoch spezialisierte, zwischengeschaltete inhibitorische Interneurone, die sogenannten interkalierten Zellen (ITCs), und/oder inhibitorische OFF-Neurone in der zentralateralen Amygdala (CeL). Beide projizieren ihrerseits zur wichtigen Outputstation in den Furchtschaltkreisen, der zentromedialen Amygdala (CeM), wodurch die Furchtsymptomatik gehemmt wird. Extinktion ist auch immer kontextabhängig. Der HPC steht sowohl mit dem IL als auch mit der BA in direktem Kontakt und ist entscheidend für die Enkodierung des Kontexts des Furchtlernens und der Extinktion. Bei Angststörungen wurde eine Dysregulation

in extinktionsrelevanten Schaltkreisen beobachtet (z. B. Hypoaktivität im IL/vmPFC), wodurch disinhibitorische Mikroschaltkreise in der Amygdala, und im prälimbischen Teil (PrL, Mensch: dorsaler anteriorer cingulärer Kortex, dACC) des mPFC überhand nehmen und u. a. zu einer übersteigerten neuronalen Aktivität in der Amygdala beitragen. In Nagern konnte diese Aktivitätssteigerung durch Verwendung hochauflösender Methoden auch in der CeM (wichtigste Outputstation der Amygdala) nachgewiesen werden [Übersicht in (Tovote et al., 2015)], während solch detaillierte Informationen aufgrund zu niedriger räumlicher Auflösung selbst durch moderne bildgebende Verfahren am Menschen bisher nicht zugänglich sind.

Basierend auf Kenntnissen vor allem aus Tier- und wenigen neueren Humanstudien scheinen D-Cycloserin (DCS), L-DOPA (Dopamin), Neuropeptid S (NPS), HDAC-Inhibitoren (HDAC-I) und microRNAs (wie miR-128 und miR-144) extinktionsrelevante Mechanismen auf verschiedenen Ebenen dieser Schaltkreise zu stärken [gelbe Boxen; Übersicht in (Singewald et al., 2015)] und so die Furchtsymptomatik zu reduzieren bzw. im Fall von NPS direkt anxiolytische Wirkungen auszuüben [violette Boxen; (Jungling et al., 2008; Dine et al., 2013)]. Neurobiologische Mechanismen, wodurch die Effekte der Extinktion als Langzeiterinnerungen erhalten bleiben, sind zum Teil bekannt, wie z. B. eine über den Transkriptionsfaktor CREB gesteuerte Proteinsynthese in der Amygdala und im IL des mPFC. Die CREB Aktivität wird u. a. durch Neurotransmitter wie Noradrenalin und Dopamin reguliert [für Details siehe Übersichtsartikel (Singewald et al., 2015)].

Exkurs 2.

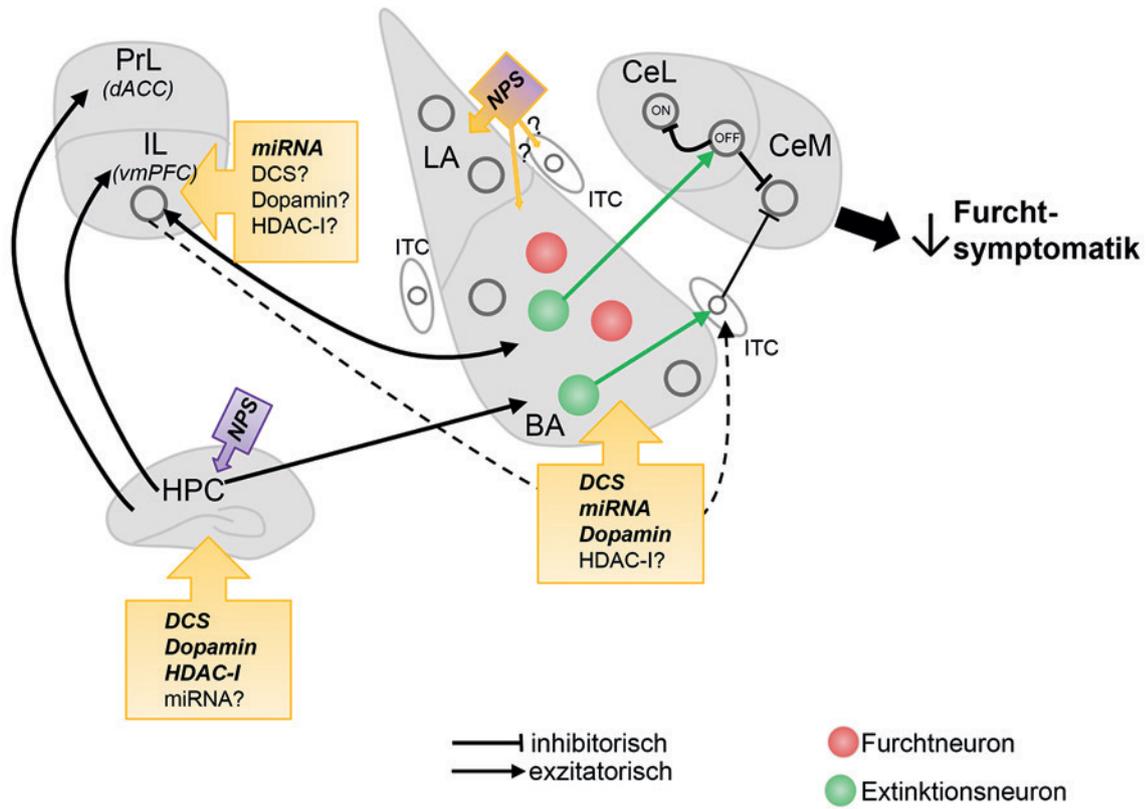


Abb. 2: Exkurs 2: Zentrale Schaltkreise der Furchtextinktion und pharmakologische Angriffspunkte zur Extinktionsförderung

Exkurs 3: Translationale Forschung zur Arzneistoff-unterstützten Augmentation von Expositionstherapien

Die ideale Entwicklung von Konzepten zur Verbesserung der Therapie von Angsterkrankungen ist schematisch dargestellt. Es bedarf der rationalen, speziesübergreifenden Grundlagen- und angewandten Forschung zur durchdachten Förderung des Furchtextinktionslernens als grund-

legenden Mechanismus der Expositionstherapie. Das zentrale Ziel ist die Entwicklung von klinisch einsetzbaren Arzneistoffen zur Steigerung der Effizienz und Akzeptanz der Expositionstherapie und damit verbunden die verbesserte Kontrolle pathologischer Angstsymptomatik.

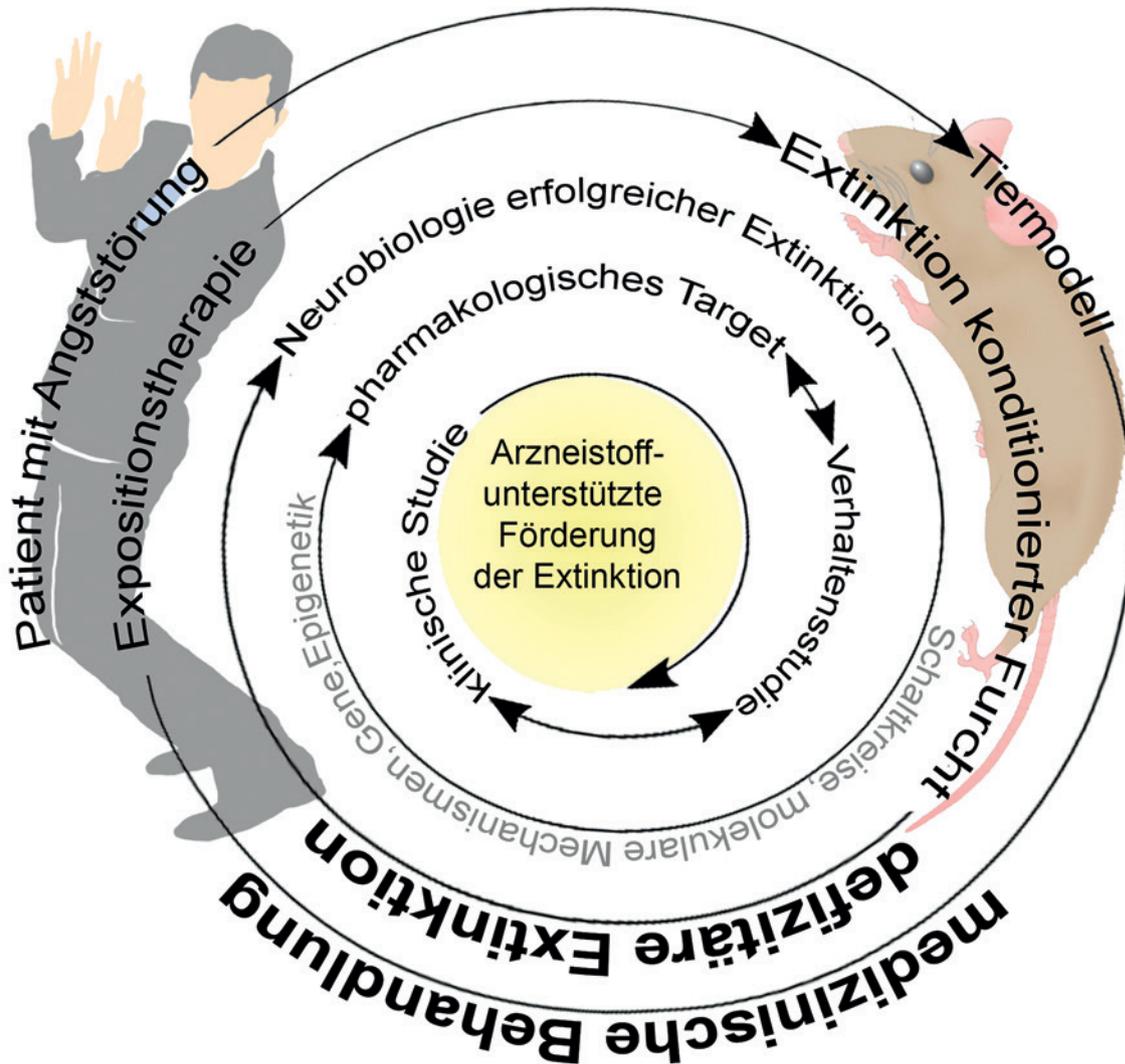


Abb. 3: Exkurs 3: Translationale Forschung zur Arzneistoffunterstützten Augmentation von Expositionstherapien

Literatur

- Abraham, A. D., Neve, K. A. and Lattal KM (2014). Dopamine and extinction: a convergence of theory with fear and reward circuitry. *Neurobiol. Learn. Mem.* 108, 65–77.
- Abraham, A. D., Neve, K. A. and Lattal, K. M. (2016). Effects of D1 receptor knockout on fear and reward learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 133, 265–273.
- Adori, C., Barde, S., Bogdanovic, N., Uhlen, M., Reinscheid, R. R., Kovacs, G. G. and Hokfelt, T. (2015). Neuropeptide S- and Neuropeptide S receptor-expressing neuron populations in the human pons. *Front. Neuroanat.* 9, 126.
- Andre, M. A. and Manahan-Vaughan, D. (2015). Involvement of Dopamine D1/D5 and D2 Receptors in Context-Dependent Extinction Learning and Memory Reinstatement. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 372.
- Bandelow, B. and Michaelis, S. (2015). Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin. Neurosci.* 17, 327–335.
- Chisholm, D., Sweeny, K., Sheehan, P., Rasmussen, B., Smit, F., Cuijpers, P. and Saxena, S. (2016). Scaling-up treatment of depression and anxiety: a global return on investment analysis. *The Lancet Psych.* 3, 415–424.
- Clark, S. D., Kenakin, T. P., Gertz, S., Hassler, C., Gay, E. A., Langston, T. L., Reinscheid, R. K. and Runyon, S. P. (2017). Identification of the first biased NPS receptor agonist that retains anxiolytic and memory promoting effects with reduced levels of locomotor stimulation. *Neuropharmacology* 118, 69–78.
- Dine, J., Ionescu, I. A., Stepan, J., Yen, Y. C., Holsboer, F., Landgraf, R., Eder, M. and Schmidt, U. (2013). Identification of a role for the ventral hippocampus in neuropeptide S-elicited anxiolysis. *PLoS One* 8, e60219.
- Domschke, K., Reif, A., Weber, H., Richter, J., Hohoff, C. et al (2011). Neuropeptide S receptor gene -- converging evidence for a role in panic disorder. *Mol. Psychiatry* 16, 938–948.
- Graham, B. M., Langton, J. M. and Richardson, R. (2011). Pharmacological enhancement of fear reduction: preclinical models. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1230–1247.
- Haaker, J., Gaburro, S., Sah, A., Gartmann, N., Lonsdorf, T. B., Meier, K., Singewald, N., Pape, H. C., Morellini, F. and Kalisch, R. (2013). Single dose of L-dopa makes extinction memories context-independent and prevents the return of fear. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E2428–2436.
- Hefner, K., Whittle, N., Juhasz, J., Norcross, M., Karlsson, R. M., Saksida, L. M., Bussey, T. J., Singewald, N. and Holmes, A. (2008). Impaired fear extinction learning and cortico-amygdala circuit abnormalities in a common genetic mouse strain. *J. Neurosci.* 28, 8074–8085.
- Hofmann, S. G., Sawyer, A. T., Korte, K. J. and Smits, J. A. (2009). Is it Beneficial to Add Pharmacotherapy to Cognitive-Behavioral Therapy when Treating Anxiety Disorders? A Meta-Analytic Review. *Int. J. Cogn. Ther.* 2, 160–175.



WORLD
PRECISION
INSTRUMENTS
Instrumenting scientific ideas

Discover our new Motorised Stereotaxic Frames with our UMP3 injector



MTM-3 Motorised Stereotaxic Frame:

- Accurate microstepping motor drive for high resolution placement
- Touch screen for ease of control
- Graphic controller display for instant operational feedback
- Brain atlas coordinates can be input into the controller, no computer required
- Coordinate distances are automatically calculated
- No more error resulting from reading Vernier scales

UMP3 Micoinjection Pump:

- A versatile pump which uses micro syringes to deliver picoliter to milliliter volumes.
- The pump is optimum for applications that require injections of precise and small amounts of liquid.
- Now with new touch screen controller

For more information please visit us at wpi-europe.com

World Precision Instruments Germany GmbH Tel +49 (0)30 6188845 E-Mail wpide@wpi-europe.com

- Ionescu, I. A., Dine, J., Yen, Y. C., Buell, D. R., Herrmann, L., Holsboer, F., Eder, M., Landgraf, R. and Schmidt, U. (2012). Intranasally administered neuropeptide S (NPS) exerts anxiolytic effects following internalization into NPS receptor-expressing neurons. *Neuropsychopharmacology* 37, 1323–1337.
- Jungling, K., Seidenbecher, T., Sosulina, L., Lesting, J., Sangha, S., Clark, S. D., Okamura, N., Duangdao, D. M., Xu, Y. L., Reinscheid, R. K. and Pape, H. C. (2008). Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 59, 298–310.
- Lin, Q., Wie, W., Coelho, C. M., Li, X., Baker-Andresen, D., Dudley, K., Ratnu, V. S., Boskovic, Z., Kobor, M. S., Sun, Y. E. and Bredy, T. W. (2011). The brain-specific microRNA miR-128b regulates the formation of fear-extinction memory. *Nat. Neurosci.* 14, 1115–1117.
- Lissek, S., Glaubitz, B., Wolf, O. T. and Tegenthoff, M. (2015). The DA antagonist tiapride impairs context-related extinction learning in a novel context without affecting renewal. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 238.
- Lukas, M. and Neumann, I. D. (2012). Nasal application of neuropeptide S reduces anxiety and prolongs memory in rats: social versus non-social effects. *Neuropharmacology* 62, 398–405.
- Milad, M. R. and Quirk, G. J. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu. Rev. Psychol.* 63, 129–151.
- Murphy, C. P., Li, X., Maurer, V., Oberhauser, M., Gstir, R., Wearick-Silva, L. E., Viola, T. W., Schaffner, S., Grassi-Oliveira, R., Whittle, N., Huttenhofer, A., Bredy, T. W. and Singewald, N. (2017). MicroRNA-Mediated Rescue of Fear Extinction Memory by miR-144-3p in Extinction-Impaired Mice. *Biol. Psychiatry*.
- Otto, M. W., McHugh, R. K., Simon, N. M., Farach, F. J., Worthington, J. J. and Pollack, M. H. (2010). Efficacy of CBT for benzodiazepine discontinuation in patients with panic disorder: Further evaluation. *Behav. Res. Ther.* 48, 720–727.
- Otto, M. W., Kredlow, M. A., Smits, J. A., Hofmann, S. G., Tolin, D. F., de Kleine, R. A., van Minnen, A., Evins, A. E. and Pollack, M. H. (2016). Enhancement of Psychosocial Treatment With D-Cycloserine: Models, Moderators, and Future Directions. *Biol. Psychiatry* 80, 274–283.
- Pape, H. C. and Wotjak, C. T. (2013). Neuronal circuits of fear memory and fear extinction. *e-Neuroforum* 4, 47–56.
- Pittig, A., van den Berg, L. and Vervliet, B. (2016). The key role of extinction learning in anxiety disorders: behavioral strategies to enhance exposure-based treatments. *Curr. Opin. Psychiatry* 29, 39–47.
- Reinscheid, R. K., Xu, Y. L. and Civelli, O. (2005). Neuropeptide S: a new player in the modulation of arousal and anxiety. *Mol. Interventions* 5, 42–46.
- Sartori, S. B., Maurer, V., Murphy, C., Schmuckermair, C., Muigg, P., Neumann, I. D., Whittle, N. and Singewald, N. (2016). Combined Neuropeptide S and D-Cycloserine Augmentation Prevents the Return of Fear in Extinction-Impaired Rodents: Advantage of Dual versus Single Drug Approaches. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19.
- Singewald, N., Schmuckermair, C., Whittle, N., Holmes, A. and Ressler, K. J. (2015). Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacol. Therapeut.* 149, 150–190.
- Slattery, D. A., Naik, R. R., Grund, T., Yen, Y. C., Sartori, S. B., Fuchsl, A., Finger, B. C., Elfving, B., Nordemann, U., Guerrini, R., Calo, G., Wegener, G., Mathe, A. A., Singewald, N., Czibere, L., Landgraf, R. and Neumann, I. D. (2015). Selective breeding for high anxiety introduces a synonymous SNP that increases neuropeptide S receptor activity. *J. Neurosci.* 35, 4599–4613.
- Tovote, P., Fadok, J. P. and Luthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 317–331.
- Whittle, N., Maurer, V., Murphy, C., Rainer, J., Bindreither, D., Hauschild, M., Scharinger, A., Oberhauser, M., Keil, T., Brehm, C., Valovka, T., Striessnig, J. and Singewald, N. (2016). Enhancing dopaminergic signaling and histone acetylation promotes long-term rescue of deficient fear extinction. *Transl. Psychiatry* 6, e974.
- Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jonsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Jennum, P., Lieb, R., Maercker, A., van Os, J., Preisig, M., Salvador-Carulla, L., Simon, R. and Steinhausen, H. C. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21, 655–679.

Anmerkung: Übersetzung der englischen Version des Artikels online verfügbar unter <https://doi.org/10.1515/nf-2017-A011>

Autoreninformationen



Dr. Simone B. Sartori

Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Zentrum für Molekulare Biowissenschaften Innsbruck (CMBI), Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Innrain 80–82, A-6020 Innsbruck, Austria
E-Mail: simone.sartori@uibk.ac.at

Simone B. Sartori studierte Pharmazie an der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Österreich. Nach einem Forschungsaufenthalt am Department of Pharmacology an der University of Oxford, GB, kehrte sie im Jahr 2001 an das Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Innsbruck zurück und promovierte dort über neurochemische Veränderungen bei depressionsartigem Verhalten mit Fokus auf Neuropeptide. Ihre Forschungsinteressen gelten seitdem neuen pharmakologischen Strategien zur Behandlung von Angststörungen und/oder Depression. Aus ihrer Forschungstätigkeit sind bisher über 35 Originalarbeiten und Übersichtsartikel hervorgegangen. Ihre wissenschaftliche Arbeit wurde mit dem Preis der Dr. Maria-Schaumayer-Stiftung und dem Wissenschaftspreis der Stadt Innsbruck ausgezeichnet.



Prof. Dr. Nicolas Singewald
 Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Zentrum für Molekulare Biowissenschaften Innsbruck (CMBI), Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Innrain 80–82, A-6020 Innsbruck, Austria
 Tel: +43 512 50758802
 Fax: +43 512 50758889
 E-Mail: nicolas.singewald@uibk.ac.at

Nicolas Singewald studierte Pharmazie an der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck und promovierte am Institut für Pharmazeutische Chemie. Anschließend untersuchte er im Rahmen einer Postdocstelle am Institut für Pharmakodynamik Mechanismen der zentralen Blutdruckregulation im Gehirn, was 1996 zur Habilitation im Fach Pharmakologie und Toxikologie führte. Als Erwin

Schrödinger – Stipendiat (FWF) arbeitete er von 1998-1999 in England an der Universität Oxford (Department of Clinical Pharmacology, Prof. Grahame-Smith) an der funktionellen Charakterisierung angstauslösender Substanzen im Gehirn. Er kehrte nach Innsbruck zurück, wo er von 1999-2001 als interimistischer Vorstand des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie eingesetzt wurde. Seit 2002 ist er Leiter der Arbeitsgruppe „Neuropharmakologie“ am Institut für Pharmazie, Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie. Dort verfolgt er u. a. im SFB44 (Cell signaling in chronic CNS disorders) sowie im Graduiertenkolleg SPIN (Signal processing in neurons) seine Forschungsinteressen, wie die Untersuchung neuronaler Schaltkreise und neurobiologischer Mechanismen von Depression, Angst- und Trauma-assoziierten Erkrankungen, sowie die Nutzung dieser Erkenntnisse zur Entwicklung neuartiger Therapiestrategien für diese prävalentesten mentalen Störungen.

Electrophysiology

Electrochemistry

HEKA
 a division of **Harvard Bioscience, Inc.**

HEKA Product Portfolio:

- Patch Clamp Amplifiers
- Data Acquisition & Analysis Software
- Two-Electrode Voltage Clamp Systems
- Complete Patch Clamp Systems
- Potentiostats
- Scanning Electrochemical Microscope (SECM)
- Data Acquisition Interfaces
- Imaging Solutions
- Micromanipulators
- Micropipette Manufacturing
- Microelectrodes
- Perfusion Systems
- Temperatur Control Units

S-Probe for Patch Clamp Amplifiers



Features & Benefits

- Extremely small size (49 x 16.5 x 14 mm)
- Weight is only 24 grams
- Flexible cable for reduced cable stress
- Bath sensor option
- Thread-based connector to pipette holder for safer electrical connection with micro-electrodes

sales@heka.com

www.heka.com

Review

Simone B. Sartori and Nicolas Singewald*

New pharmacological strategies for augmenting extinction learning in anxiety disorders

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-A011>

Abstract: Despite advances in the treatment of fear-, anxiety- and trauma-related disorders, a considerable proportion of patients shows only partial long-term therapeutic benefit with existing treatments. A promising option in improving therapy is speeding up and boosting the effect of exposure-based therapy (EBT) by pharmacological interventions. Here, we will discuss select examples of novel concepts in augmenting fear extinction, the central mechanisms of EBT. Based on accumulating knowledge from animal and human studies concerning the neurocircuits and neurobiological mechanisms underlying successful fear extinction, diverse potential pharmacological targets have been identified to optimize the efficacy of fear extinction. We focus here on selected examples of these targets and present translational evidence for strengthening fear inhibitory learning by using L-DOPA and D-cycloserine. Furthermore, the potential of HDAC inhibitors and microRNAs (e. g. miR-144) as epigenetic targets, as well as neuropeptide S as a model substance with combined acute anxiolytic and extinction-facilitating properties are discussed. The presented mechanisms represent promising novel strategies that may be useful in the future for augmenting the efficacy and improving the acceptance of EBT in the treatment of anxiety disorders, although further work remains to be done in characterising the underlying modes of action and safety aspects.

Keywords: fear extinction; cognitive enhancer; L-DOPA; Neuropeptide S; D-cycloserine.

Introduction

The lifetime prevalence of fear-, anxiety- or trauma-related disorders is 20–30%, constituting about 62 million people in Europe, who are diagnosed with one of these disorders (Wittchen et al., 2011; Bandelow and Michaelis, 2015). Characteristics of these disorders are the perception and occurrence of disproportionate fear and anxiety states, avoidance behaviour and stress reactions. These are often caused by certain key stimuli such as objects, situations and other extrinsic, but also intrinsic stimuli. Acquired behaviour patterns, like for example in the course of conditioning, also often play a role; the involved associations of conditioned stimuli (CS) and unconditioned stimuli (US) (see excursus 1) often occur subconsciously. The disease often starts early in life, making patients sometimes suffer for decades from their anxiety disorder. Many of those disorders are linked to a relatively high risk of relapse and various comorbidities like depression and addiction. Apart from their reduced quality of life and the burden of suffering both by the patients and their social environment, the economic costs for medical treatment, follow-up costs, in particular indirect costs for sick leave, early retirement, reduced productivity at work etc. are immense. However, the treated patients' labour participation and contribution to gross domestic product are about four times as much as costs for therapy (Chisholm et al., 2016).

Currently established therapies of anxiety disorders include and combine psychotherapeutic and pharmacological interventions. Therapies aim to attenuate the severity of symptoms and inhibit the acquired fear (see excursus 1). Ideally, patients are thereby being closely supervised by psychiatrists and psychotherapists. Medical long-term treatment mainly consists of antidepressants like selective serotonin- (SSRIs) and/or noradrenaline-reuptake inhibitors. These are capable of alleviating symptoms of fear and of adjusting impetus and motivation. During the acute phase of anxiety, anxiolytics like benzodiazepines (e. g. Lorazepam, Alprazolam) can temporarily be given in order to attenuate symptoms – long-term treatment is not recommended due to their addiction poten-

*Corresponding author: Nicolas Singewald, Institute of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology, Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), Leopold Franzens University Innsbruck, Innrain 80–82, A-6020 Innsbruck, Austria, Mail: nicolas.singewald@uibk.ac.at

Simone B. Sartori, Institute of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology, Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), Leopold Franzens University Innsbruck, Innrain 80–82, A-6020 Innsbruck, Austria, Mail: simone.sartori@uibk.ac.at

tial. Apart from medication there are different psychotherapeutic interventions, which are aimed at reinforcing, in anxiety patients often poorly established, fear inhibiting mechanisms as well as at learning to control fear symptoms more effectively. Exposure therapy is of particular importance for treatment by behaviour therapy. In such, the patient is repeatedly confronted in an *in vivo* setting or also in virtual reality, with stimuli and memories, which trigger fear or anxiety. The newly acquired learning experience, namely that the expected distress/unbearable situation does not occur or at least not in the expected dimension (expected contingency “prediction error”) initiates new learning. The fear causing situation is re-assessed and ultimately anxiety symptoms and avoidance behaviour will be reduced (see excursus 1). Extinction as the central mechanism of exposure therapy involves active, new inhibitory associative learning while, especially during prolonged exposure, likewise non-associative habituation mechanisms are involved. The novel encoded memory traces for “CS-no US” (safety) suppress the behavioural characteristic of the still existing (fear)-memory traces. Implicit memory and, according to the extent of the therapist’s cognitive instructions, also explicit memory is involved in this process.

Despite a high success rate, exposure therapy does not work for all patients. Up to 40% of the patients, who completed the therapy, do not show clinically relevant longterm treatment success (Bandelow and Michaelis, 2015). Even after completing an initially successful exposure therapy the relapse rate is relatively high, which can be attributed to the fact that the initial fear memory does not get erased by extinction. Thus, by certain stimuli/circumstances this initial fear memory trace can be reactivated and the fear reaction will be triggered again: i) by a prolonged period after completing the last exposure session (spontaneous recovery of the fear reaction), ii) by confrontation with the fear-triggering stimuli outside the “safe” therapy environment (context-dependent renewal of the fear reaction) or iii) following confrontation with aversive stimuli like the original fear stimulus or general stress-laden events can revive the initial CS-US associations (“reinstatement”). Another potential drawback of therapy is the subjectively unbearable psychological burden of the exposure, which a considerable number of patients is anxious of (“fear of fear”).

Various, in recent years newly established approaches are meant to improve the efficacy of exposure therapy and minimise therapy-related stress. The current focus of research is the significant facilitation of extinction learning during therapy sessions (extinction training) and the consolidation of extinction memory. Non-pharmacologi-

cal optimisation approaches vary from adapting the “dosage” of exposure, i.e. modifying frequency, duration, intensity as well as varied and prolonged exposure sessions, restricting safety cues,... (Pittig et al., 2016) to exploiting consolidation mechanisms during sleep. It is still hoped that a combination of currently used anxiolytic drugs will produce a synergistic (over-additive) therapeutic effect and at the same time will be able to attenuate the psychological stress of the exposure as such, however, this did not prove successful as yet (Hofmann et al., 2009; Otto et al., 2010). Thus, alternative pharmacological approaches aim at substances like neuroenhancers (“cognitive enhancers”), which help to initiate the new learning process and support formation of a fear-inhibiting extinction memory by theoretically modulating mechanisms like alertness, motivation, encoding but mainly by consolidating the extinction memory into a long term memory. This occurs via interaction of signal cascades in brain regions and circuits, which are important for extinction processes (excursus 2). Although experiencing fear during exposure might be an important element for the therapeutic learning effect, it is pursued to develop substances with acute anxiety reducing effects but without memory-impairing sedation. Currently no drug, approved for anxiety therapy, complies with those criteria [for review see (Singewald et al., 2015)].

We now present a selection of drugs and model substances, which have been developed based on growing animal and human data on extinction (Milad and Quirk, 2012), its underlying neuronal circuits and mechanisms (excursus 2). Apart from these selected examples, there are a number of other, here not further mentioned substances achieving similar effects via different pharmacological targets, such as glucocorticoids, yohimbine, neuropeptides like neuropeptide Y, opioids and oxytocin, growth factors like BDNF and fibroblast growth factor-2, cannabinoids, mGLUR7 receptors [for review see (Graham et al., 2011; Singewald et al., 2015)]. These drugs have been shown to promote mechanisms underlying the acquisition and/or consolidation (excursus 1) of extinction and some of them are already tested in clinical trials. In collaboration with others our research group has contributed to the development and/or further characterization of the following substances which will be discussed in more detail: L-DOPA and D-cycloserine (DCS) are examples of drugs approved for other indications and have been used in experimental studies in humans, while the other examples of substances discussed here are at very early stages of development. These are HDAC inhibitors and microRNAs as examples of epigenetic targets and neuropeptide S (NPS) as a rare example of an acute anxiolytic as well as

extinction-promoting model substance. Since a single administration of the substance occurs shortly before and/or after the exposure session, fewer side effects and better compliance of the patients are expected compared to chronic drug administration.

D-cycloserine: a translational success story

Based on animal studies, which revealed that activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors is significantly involved in fear-extinction learning processes, the extinction facilitating effect of the NMDA partial agonist DCS was first reported in 2002 [for review see (Otto et al., 2016)]. DCS binds directly to glycine-sensitive NMDA-receptors in extinction-related brain areas like the amygdala (excursus 2) and promotes a fundamental molecular mechanism in memory formation, long-term potentiation (LTP). Other preclinical studies in different species confirmed the positive effect of DCS on augmentation of extinction learning and particularly consolidation of those memory contents [e. g. (Sartori et al., 2016); for review see (Singewald et al., 2015)]. Since DCS has been approved as a tuberculosis drug for many years, it took only two years until first positive results were published by K. Ressler and colleagues, reporting on a combination of DCS and exposure therapy in patients with fear of heights, which were followed by studies on patients with specific phobias, panic disorders, and posttraumatic disorders. Those first studies demonstrated that exposure therapy for certain anxiety disorders significantly benefits from DCS. This, however was followed by contradictory results so that several meta-analyses were unable to validate a clear result regarding the extinction augmenting effect of DCS [for review see (Otto et al., 2016)]. This could be due to the heterogeneity of the studied disorders and the participants' co-medications (e. g. SSRIs) as well as the fact of possible additional actions of DCS which have not received sufficient attention. Meanwhile it is known that during exposure sessions, in which no fear reduction takes place ("within session habituation"), augmentation of reconsolidation of the patient's fear memory is possible [for review see (Otto et al., 2016)]. Thus, the current recommendation is to administer DCS directly after "successful" exposure sessions in a controlled, stress-free environment. If DCS is given in a single to a few low doses in a restricted time period, it seems indeed able to increase the therapeutic effect of exposure sessions [for review see (Otto et al., 2016)]. Numerous currently registered studies involving different patient groups

(see <https://clinicaltrials.gov/>) are supposed to clarify this further.

L-DOPA

The neurotransmitter dopamine belongs to the group of catecholamines and is abundant in the brain. Dopaminergic projections, which are potentially important for extinction processes, arise from the ventral tegmentum to the medial prefrontal cortex (mPFC), hippocampus and to the amygdala, which hold key functions in the processing of fear extinction (see excursus 2), as well as to the nucleus accumbens [for review see (Abraham et al., 2014)]. During and after a successful extinction session dopamine release in the mPFC is increased [for review and original literature see (Singewald et al., 2015)] and key markers of dopaminergic signaling pathways are upregulated in the amygdala (Whittle et al., 2016). In a translational study in collaboration with the groups of R. Kalisch and H.C. Pape we could show that administration of L-DOPA, a bioprecursor of dopamine, is able to augment extinction memory in extinction-competent mice and humans and importantly reduces relapse rates of fear reactions in both species (Haaker et al., 2013). Further, we were recently able to demonstrate an extinction-triggering effect of a single dose of L-DOPA in a clinically relevant mouse model of deficient extinction [(Whittle et al., 2016), see excursus 1]. It remains to be shown whether these promising results can be transferred to clinical trials with anxiety patients. Since L-DOPA is already approved for the treatment of Morbus Parkinson, its single dose administration either before or after a limited number of exposure sessions is assumed to be safe, which expedites approval of clinical studies. This is substantiated by the previously described, improved and long-lasting effect of exposure therapy in a small group of therapy-resistant patients with post-traumatic stress disorder following a combination with MDMA (3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine; "ecstasy"), which activates dopaminergic (apart from serotonergic and other neurotransmitter) signaling pathways [(for review and original references see (Singewald et al., 2015)].

Mechanisms, by which L-DOPA improves extinction remain to be elucidated, but likely operate via improving consolidation of the new extinction learning process and modulating fear expression [for review see (Abraham et al., 2014; Singewald et al., 2015)]. Possibly promotion of dopaminergic signaling pathways also has an effect on motivation and contingency expectancy during the process of extinction learning [(Andre and Manahan-Vaughan, 2015;

Lissek et al., 2015); for review see (Abraham et al., 2014)]. Apart from potentially involved brain areas (see excursus 2) it remains to be shown which dopamine receptor(s) mediate the extinction augmenting effect of L-DOPA. Dopamine activates five metabotropic receptors, mainly coupled to either stimulating G_s or G_α proteins (D1-like receptors) or to an inhibiting $G_{i/o}$ protein (D2-like receptors), yet, also acting via other signaling pathways [for review see (Abraham et al., 2014)]. D1- and D2-like receptors control neuronal activity in the amygdala and in the mPFC in a finely tuned interaction (see excursus 2). In fact, activation of D1 receptors in the mPFC was shown to improve consolidation of fear extinction, possibly via interaction with excitatory NMDA receptors and LTP-dependent mechanisms [for review see (Abraham et al., 2014)]. However, due to the moderate selectivity of available ligands, a D5-mediated component cannot completely be ruled out [for review see (Abraham et al., 2014; Singewald et al., 2015)]. Avoiding the selectivity issue by using a conventional genetically modified mouse line, latest data suggest that D1-receptors are less involved in certain forms of association learning than assumed so far (Abraham et al., 2016). Thus, it seems important to consider the role of other dopamine receptors in fear extinction, especially because dopamine binds with a higher affinity to those than to D1-receptors.

Neuropeptide S

Another therapeutic problem worth improving is that about 30% of patients refuse participating in exposure therapy due to their anticipated (enormous) fear-/stress reaction during confrontation with the fear-triggering stimulus. Administration of acute anxiety-reducing substances like benzodiazepines prior to exposure therapy might have a beneficial effect in this respect. However, while benzodiazepines attenuate the arising anxiety, and therefore often allowed approaching exposure, they interfere with extinction processes e. g. via their sedative effect and can evoke an “interoceptive state”, which also triggers state-dependent learning. On the whole, this rather diminished the efficiency of exposure therapy [for review see (Otto et al., 2010)]. Similarly, due to their absent anxiolytic effect, psychostimulants like amphetamines, which raise vigilance and attention, are not suitable for this purpose. Hence, there is a need for substances, which hold both anxiety-reducing and learning process-promoting properties.

Some studies suggest that the 20 amino acids NPS might fulfil these requirements of a model substance. Ex-

pression of NPS in the brain is limited compared to other neuromodulators, however, the NPS receptor is expressed in rodent brain areas, which are relevant for extinction (see excursus 2). Animal studies revealed the specific pharmacological effects of NPS: anxiolytic and activity promoting and on top of that extinction memory augmenting [(Jungling et al., 2008; Slattery et al., 2015), for review see (Reinscheid et al., 2005)]. Moreover, NPS has been shown to elicit a very early anxiolytic/fear inhibiting effect and to initiate extinction learning in severely extinction-deficient rodents (Sartori et al., 2016). In the rodent brain the extinction augmenting, fear inhibiting effects of NPS likely result in attenuated activity of fear-output neurons in the centromedial amygdala, supposedly by stimulating highly specific inhibitory interneurons, the so-called intercalated cells [ITCs, see excursus 2; for review see (Pape and Wotjak, 2013)]. In addition, NPS seems capable of modulating other extinction-relevant neurotransmitter systems, including dopamine in the mPFC and hippocampus. At the moment it is not clear whether and how these rodent data can be translated into humans in particular due to lacking information on the exact distribution of the NPS system in the human brain. Even though polymorphisms in the NPS receptor, which alter its function, have been associated with panic disorders (Domschke et al., 2011), reported species-specific differences should be considered in its further development as potential pharmacological target (Adori et al., 2015).

Despite promising pre-clinical results, concomitant therapy with NPS and exposure therapy is unlikely in the near future, mainly because there is no blood brain barrier-penetrant NPS receptor agonist or biased agonist with a potentially even improved side effect profile (Clark et al., 2017) at present. While efforts are high to develop such non-peptide NPS receptor agonists, administration of NPS via the nasal mucosa might be a non-invasive alternative, which is already utilised for other neuropeptides like e. g. oxytocin. This approach is supported by preliminary data from mice which show that only 30 minutes after intranasal administration low concentrations of NPS can be found in the brain, where it binds to NPS receptors and mediates an anxiolytic effect (Ionescu et al., 2012; Lukas and Neumann, 2012).

Epigenetic mechanisms

Formation of extinction memories involves interaction of focused signal transduction, gene expression and translation of certain proteins, which are important for learning

and memory-associated mechanisms including synaptic plasticity. Gene activity and gene expression is regulated via various epigenetic mechanisms. During extinction learning, regulatory mechanisms, e. g. via microRNAs miR128b (Lin et al., 2011) or miR144 [(Murphy et al., 2017); for review see (Singewald et al., 2015)] and also modifications of DNA and DNA-associated proteins, the histones, play a role. It seems that the degree of histone acetylation is of particular importance for extinction processes. Histone acetyltransferases transfer acetyl residues to the amino acids lysine at the N-terminal end of histone proteins and promote gene expression by the thereby associated chromatin disaggregation. Histone deacetylases (HDAC) on the other hand remove acetyl groups from lysine and thus inhibit gene transcription. Fine tuning of acetylation and deacetylation of histones during and after extinction training determines whether and to what extent gene expression and downstream processes, crucial for development of a steady extinction memory, occur. Although at present our knowledge of involved substrates is still limited, it seems that increased acetylation in the promoter region of the growth factor BDNF (brain-derived neurotrophic factor) as well as certain NMDA receptor subunits (e. g. *grin2b*), neuroplasticity-associated immediate early genes including *c-fos* and *arc* and, as mentioned above, dopaminergic genes (Whittle et al., 2016) play a crucial role in consolidation of extinction [for review see (Singewald et al., 2015)].

Histone acetylation can be pharmacologically increased by HDAC-inhibitors. Administration of various HDAC inhibitors, concomitant to extinction, was studied in animal models. Trichostatin A, sodium butyrate, Entinostat (MS-275), Vorinostat (SAHA), valproate (VPA) and CI-944 all exhibit fear extinction-promoting properties [for review see (Singewald et al., 2015)]. CI-944, MS-275 and SAHA were able to compensate extinction deficits in various animal models, which suggests clinical potential of those substances. For example, it was shown that MS-275 improved fear extinction in extinction-deficient mice, which was accompanied by increased histone H4 acetylation in extinction-related brain regions (Whittle et al., 2016). To date, tested substances are unspecific HDAC inhibitors, which inhibit several HDAC isoforms with a preference for those of class 1 including HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC8. Studies in genetically modified mice revealed that gene silencing of HDAC2 but not HDAC1 in the forebrain has a beneficial effect on fear extinction [for original literature and review see (Singewald et al., 2015)]. Specific HDAC inhibitors are currently under development in order to reduce potential side effects and also to increase efficacy.

Concept of dual pharmacotherapy concomitant to exposure therapy

In extinction-deficient individuals including anxiety patients (see excursus 1), administration of a single drug concomitant to fear extinction does often not suffice to support the extinction memory augmenting mechanism in an extent that temporal, spatial or stress-dependent fear relapses can be prevented [for review see (Singewald et al., 2015)]. Moreover, at present, no drug, which is able to pass the blood brain barrier, has combined memory promoting, acute anxiolytic, as well as non-sedating properties. Using extinction-deficient mice, our group was able to show for the first time that only the administration of NPS before and DCS after successful extinction training, but not administration of NPS alone results in formation of a robust extinction memory, which withstands various types of fear relapses (Sartori et al., 2016). According to this dual pharmacotherapeutic concept it was shown that fear relapses in extinction-deficient mice can also be reduced by combined administration of L-DOPA and the HDAC-inhibitor MS-275, concomitant to extinction training (Whittle et al., 2016).

Summary and outlook

In this article we review a selection of potential pharmacological strategies for strengthening extinction processes in the course of exposure sessions. These strategies aim at improved therapeutic success in regard to efficacy, clinical long-term success and acceptance of exposure therapy. Based on the advanced knowledge on extinction-related circuits and biological processes gained from animal and human work [see excursus 2; for review see (Milad and Quirk, 2012)], a rational administration of certain substances has been tested in validated animal models as well as even in volunteers and suitable patient groups (see excursus 3). Apart from targeting glutamatergic and dopaminergic signalling with DCS and L-DOPA, respectively, the results allowed to evolve novel (e. g. NPS), and a number of other pharmacological target candidates, which were not discussed in detail in this article (e. g. glucocorticoids, yohimbine, neuropeptides like neuropeptide Y, opioids and oxytocin, growth factors like BDNF and fibroblast growth factor-2, cannabinoids, mGluR7 receptors), but also non-pharmacological strategies like deep brain stimulation in the nucleus accumbens [for review see (Graham et al., 2011; Singewald et al., 2015)].

In recent years there was increased awareness of the systematic administration of such potentially memory promoting substances tightly timed with extinction- and exposure training. While many of the mentioned substances are at a very early stage of investigation, the development of DCS is exemplary for successful, translational research from bench to bedside, which hopefully will be reproduced by more substances like e. g. L-DOPA in the near future (excursus 1–3). Based on animal and clinical research fear and fear extinction/exposure-based therapy supported by pharmacotherapy was further optimised in order to avoid off-target effects like the potential facilitation of reconsolidation of the initial fear memory traces. The concept of a dual pharmacotherapeutic approach opens up new possibilities to combine anxiety reducing and extinction memory facilitating substances. This might also be a potential way of reducing the patients' psychological stress before and during exposure therapy.

There are current studies on the molecular mechanisms, as well as the interplay of certain brain areas and circuits, which underlie extinction consolidation involving neuroenhancers, epigenetic modulators and other learning and memory modulating approaches. Studies in rodents need to be confirmed [see e. g. (Milad and Quirk, 2012)] and, if necessary, adapted in humans. Results, which have been and will be obtained, should contribute to identify effective pharmacological targets in order to strengthen psychotherapies and thus to provide optimised and permanent therapy of trauma- and anxiety-related disorders.

Acknowledgement: We thank the FWF (Austrian Science Fund) for financial support of our research described here as well as Dr. Maria Kharitonova and Zeljko Stevic for their support with the figures.

Excursus 1: Modulation of extinction as an experimental approach of exposure therapy

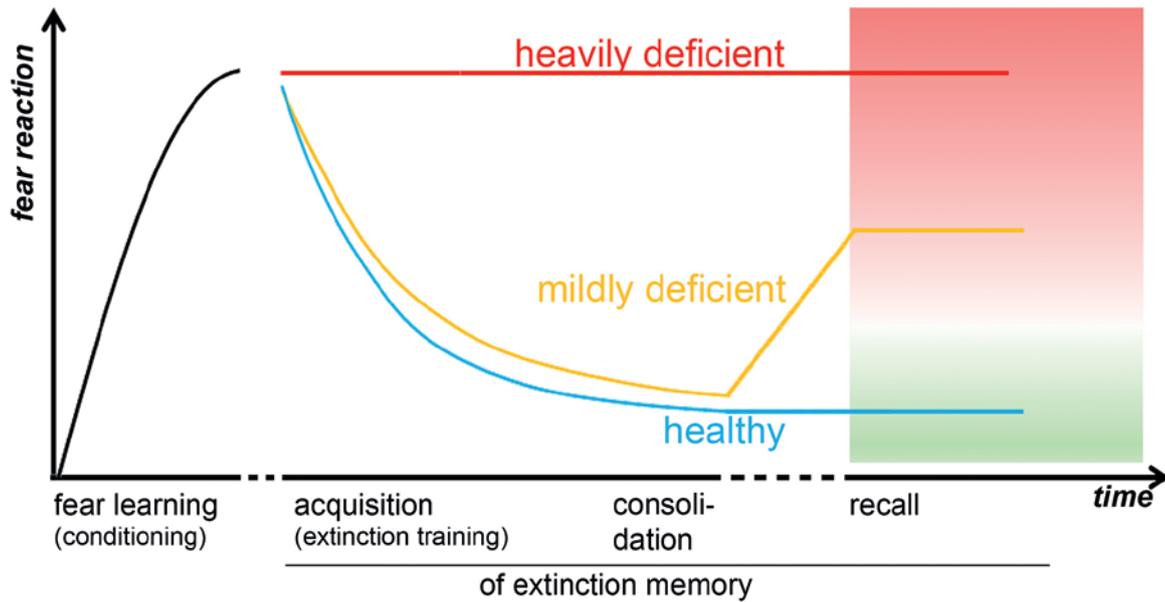
Extinction of conditioned fear as the central mechanism of exposure therapy is based on various theoretical approaches, which have been significantly advanced by new data from the last decades. Apart from the experimental approach (the actual extinction training) and reduction of the conditioned reaction as such, extinction also describes a neuronal learning process, which forms the base of active re-learning and formation of a new inhibitory memory. **A.** Fear learning occurs via (Pavlovian) conditioning and represents a learning model important in many anxiety disorders. Thereby, a previously neutral, conditioned stimulus (CS; e. g. creaky car tyres in the traffic, in experimental setups e. g. sound, light or a computer image) is associated with aversive unconditioned stimuli [US; e. g. car accident, in experimental setups e. g. a mild electric shock to the hand, finger (humans) or foot/paw (animal)]. Circuits in the amygdala and other brain regions allow experience-dependent acquisition and storage of fear memory traces. Via activation of these memory traces the CS ultimately triggers an anticipatory fear reaction independent from the US. In patients suffering from anxiety disorders, this reaction is disproportional, which is partly based on dysregulated corticolimbic circuits of the fear system in the brain

During extinction training the CS is repeatedly presented without US in a usually different context. A new, inhibitory association “CS-no US” (“acquisition of extinc-

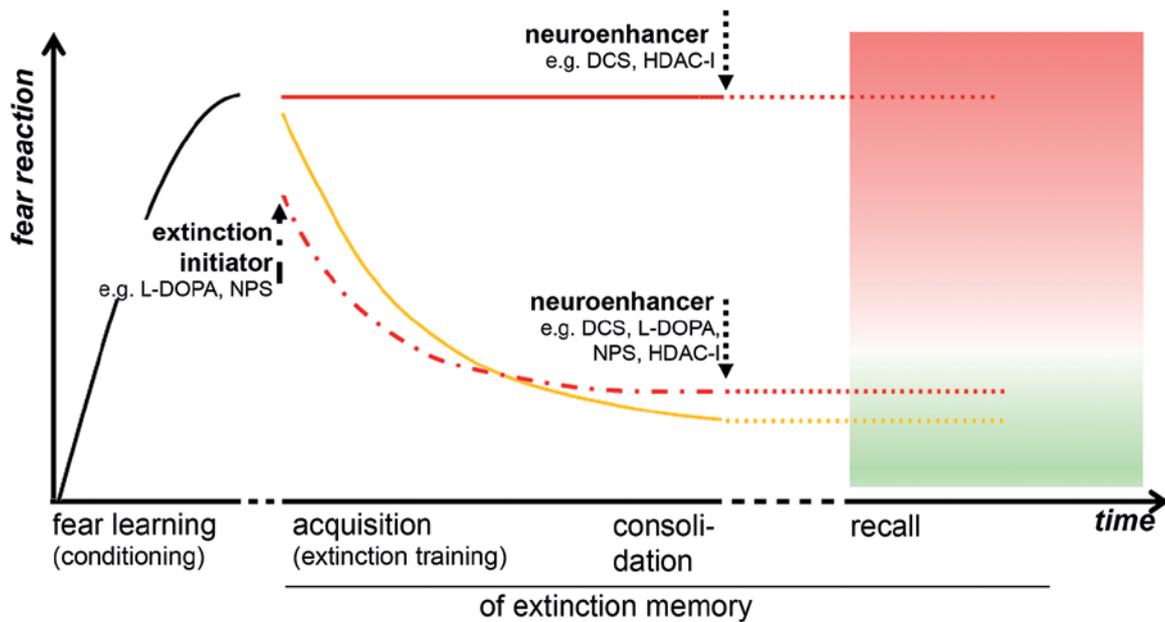
tion memory”) is formed and consolidated. This now exists in parallel to the initial excitatory “CS-US” association and has an inhibitory effect. Fear symptoms are reduced and remain low in the long-term (see healthy/blue line) which can be used as a critical index for successful consolidation of the extinction acquisition. In patients with anxiety- or trauma-associated disorders these inhibitory learning mechanisms are often dysfunctional as relapse of the fear reaction (mildly deficient; yellow curve) occurs after initially successful extinction training or when even no initial extinction learning is present (severely deficient; red curve). **B.** Mechanisms of extinction learning can be pharmacologically augmented. In this context we introduce two pharmacological concepts: 1. Administration of *one* memory augmenting drug (neuroenhancer) for mildly deficient extinction with initial extinction learning, ideally following successful extinction training (see text). 2. Since the here presented selected examples DCS and HDAC-Is were not effective for severely deficient extinction when given before training (Hefner et al., 2008; Sartori et al., 2016), a combination of substances may be helpful with one given prior to the training, initiating extinction learning and allowing gradual fear reduction (extinction initiator), and a second given after the training, augmenting consolidation mechanisms (neuroenhancer). Abbreviations: DCS: D-cycloserine; HDAC-I: histone deacetylase inhibitor; NPS: neuropeptide S.

Excursus 1.

A. Course of anxiety symptoms upon successful and deficient extinction



B. Options of drug-supported extinction promotion



- without pharmacological adjunct
- - - after administration of an extinction initiator
- after administration of a neuroenhancer

Fig. 1: Excursus 1: Modulation of extinction as an experimental approach of exposure therapy

Excursus 2: Central circuits of fear extinction and pharmacological targets for extinction augmentation

According to the current state of knowledge, a context-dependent, inhibitory “CS-no US” memory trace is primarily formed by neuronal circuits, which involve the amygdala, medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus (HPC) representing important elements of fear circuits [for review see (Pape and Wotjak, 2013)]. Although homologies between the animal and human brain cannot always be clearly drawn, the amygdala function in emotional processing is highly conserved across species and similar activity changes in parts of the cortex and amygdala are observed in humans and rodents during fear extinction [for review see (Milad and Quirk, 2012)]. The ventrally localised infralimbic region (IL) of the mPFC (*ventromedial prefrontal cortex, vmPFC in human brain*) is important for retrieving and possibly forming extinction memory and can activate excitatory extinction neurons (green symbols) in the basal amygdala (BA). Extinction neurons activate highly specialised, intercalated inhibitory interneurons, the so-called intercalated cells (ITCs), and/or inhibitory OFF-neurons in the central lateral amygdala (CeL). Both types of neurons project to the important output station of fear circuits, the central medial amygdala (CeM), contributing to the inhibition of fear symptoms. Extinction also occurs context-dependent. The HPC is linked with the IL as well as the BA and is crucial for encoding the context of fear learning and extinction. A dysregulation of extinction-related circuits has been observed in anxiety disorders

(e. g. hypoactivity in the IL/vmPFC,), which leads to disinhibition of microcircuits in the amygdala. These are fairly well characterised in the rodent, but not in the human brain mainly due to limited resolution of current imaging techniques. Furthermore, the prelimbic part of the mPFC (PrL; *dorsal anterior cingulate cortex, dACC in human brain*), is thought to contribute to excessive neuronal activity in the amygdala, e. g. in its output region CeM, as shown in rodents [for review see (Tovote et al., 2015)].

Based primarily on animal studies and a few emerging human studies (see text), D-cycloserine (DCS), L-DOPA (dopamine), neuropeptide S (NPS), HDAC-inhibitors (HDAC-I) and microRNAs (like miR-128 and miR-144) seem to augment extinction-related mechanisms at various levels of those circuits [yellow boxes]; for review see also (Singewald et al., 2015)], reduce fear symptoms and in the case of NPS exert anxiolytic effects [purple boxes; (Jungling et al., 2008; Dine et al., 2013)], respectively. Neurobiological mechanisms, which contribute to maintain the effects of extinction as a long-term memory, are partly decoded. For example, it has been revealed that protein synthesis is mediated via the transcription factor CREB in the amygdala and in the IL of the mPFC. CREB activity is regulated by various neurotransmitters including noradrenaline and dopamine [for details see review (Singewald et al., 2015)].

Excursus 2.

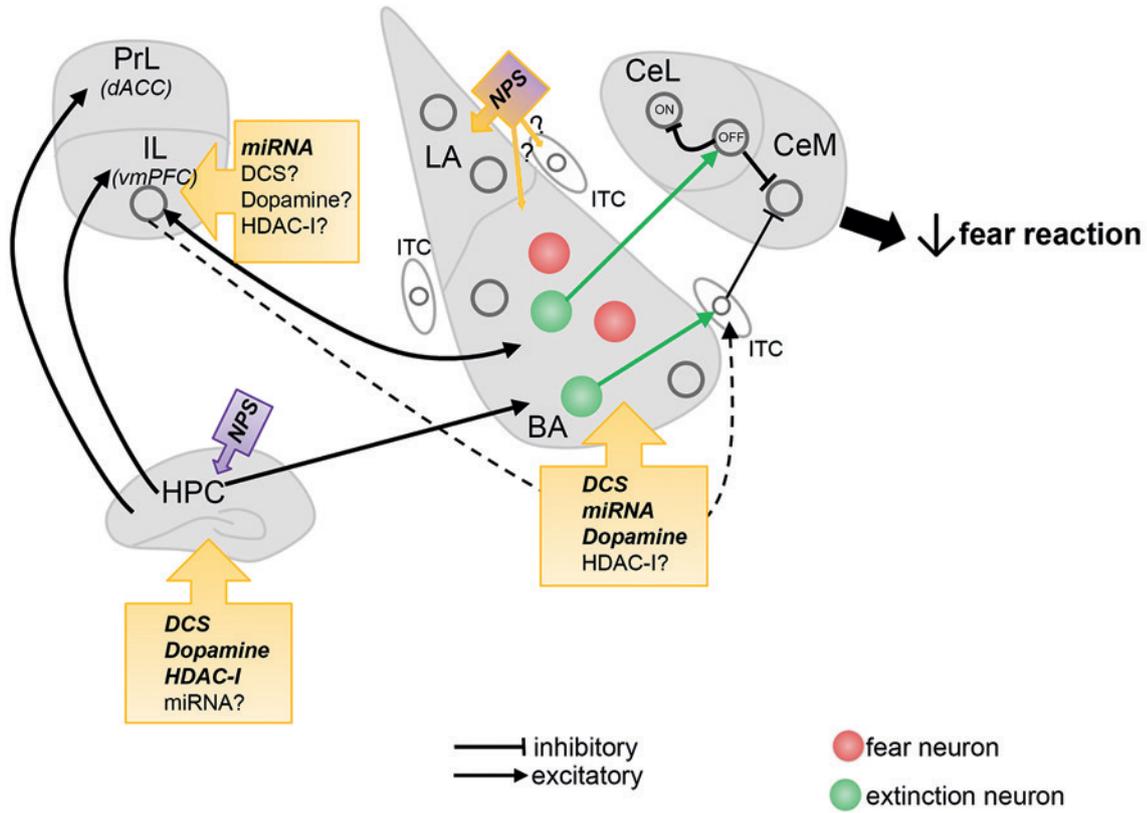


Fig. 2: Excursus 2: Central circuits of fear extinction and pharmacological targets for extinction augmentation

Excursus 3: Translational research for drug-supported augmentation of exposure therapies

The ideal development of concepts for improving therapy of anxiety disorders is illustrated schematically. There is a need for rational, multi-species basic and translational research in order to augment fear extinction learning as the

central mechanisms of exposure-based therapy. The focus of this research is development of clinically approved drugs to maximise efficacy and acceptance of exposure therapy.

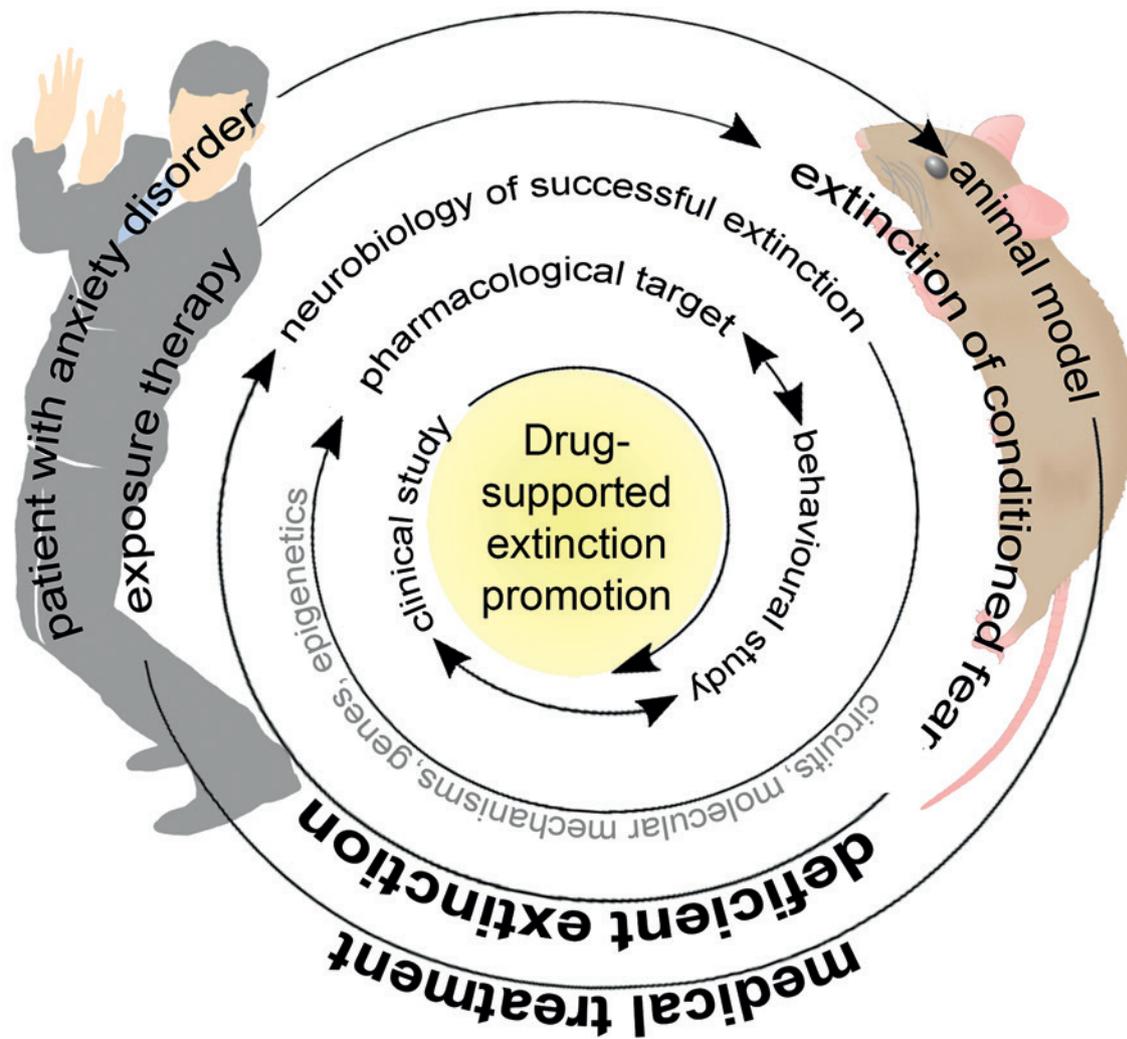


Fig. 3: Excursus 3: Translational research for drug-supported augmentation of exposure therapies

References

- Abraham A. D., Neve K. A., Lattal K. M. (2014). Dopamine and extinction: a convergence of theory with fear and reward circuitry. *Neurobiol Learn Mem* 108:65–77.
- Abraham A. D., Neve K. A., Lattal K. M. (2016). Effects of D1 receptor knockout on fear and reward learning. *Neurobiol Learn Mem* 133:265–273.
- Adori C., Barde S., Bogdanovic N., Uhlen M., Reinscheid R. R., Kovacs G. G., Hokfelt T. (2015). Neuropeptide S- and Neuropeptide S receptor-expressing neuron populations in the human pons. *Front Neuroanat* 9:126.
- Andre M. A., Manahan-Vaughan D. (2015). Involvement of Dopamine D1/D5 and D2 Receptors in Context-Dependent Extinction Learning and Memory Reinstatement. *Front Behav Neurosci* 9:372.
- Bandelow B., Michaelis S. (2015). Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci* 17:327–335.
- Chisholm D., Sweeny K., Sheehan P., Rasmussen B., Smit F., Cuijpers P., Saxena S. (2016). Scaling-up treatment of depression and anxiety: a global return on investment analysis. *The Lancet Psychiatry* 3:415–424.
- Clark S. D., Kenakin T. P., Gertz S., Hassler C., Gay E. A., Langston T. L., Reinscheid R. K., Runyon S. P. (2017). Identification of the first biased NPS receptor agonist that retains anxiolytic and memory promoting effects with reduced levels of locomotor stimulation. *Neuropharmacology* 118:69–78.
- Dine J., Ionescu I. A., Stepan J., Yen Y. C., Holsboer F., Landgraf R., Eder M., Schmidt U. (2013). Identification of a role for the ventral hippocampus in neuropeptide S-elicited anxiolysis. *PLoS One* 8:e60219.
- Domschke K., Reif A., Weber H., Richter J., Hohoff C., et al (2011). Neuropeptide S receptor gene -- converging evidence for a role in panic disorder. *Mol Psychiatry* 16:938–948.
- Graham B. M., Langton J. M., Richardson R. (2011). Pharmacological enhancement of fear reduction: preclinical models. *Br J Pharmacol* 164:1230–1247.
- Haaker J., Gaburro S., Sah A., Gartmann N., Lonsdorf T. B., Meier K., Singewald N., Pape H. C., Morellini F., Kalisch R. (2013). Single dose of L-dopa makes extinction memories context-independent and prevents the return of fear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E2428–2436.
- Hefner K., Whittle N., Juhasz J., Norcross M., Karlsson R. M., Saksida L. M., Bussey T. J., Singewald N., Holmes A. (2008). Impaired fear extinction learning and cortico-amygdala circuit abnormalities in a common genetic mouse strain. *J Neurosci* 28:8074–8085.
- Hofmann S. G., Sawyer A. T., Korte K. J., Smits J. A. (2009). Is it Beneficial to Add Pharmacotherapy to Cognitive-Behavioral Therapy when Treating Anxiety Disorders? A Meta-Analytic Review. *Int J Cogn Ther* 2:160–175.
- Ionescu I. A., Dine J., Yen Y. C., Buell D. R., Herrmann L., Holsboer F., Eder M., Landgraf R., Schmidt U. (2012). Intranasally administered neuropeptide S (NPS) exerts anxiolytic effects following internalization into NPS receptor-expressing neurons. *Neuropsychopharmacology* 37:1323–1337.
- Jungling K., Seidenbecher T., Sosulina L., Lesting J., Sangha S., Clark S. D., Okamura N., Duangdao D. M., Xu Y. L., Reinscheid R. K., Pape H. C. (2008). Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 59:298–310.
- Lin Q., Wei W., Coelho C. M., Li X., Baker-Andresen D., Dudley K., Ratnu V. S., Boskovic Z., Kobor M. S., Sun Y. E., Bredy T. W. (2011). The brain-specific microRNA miR-128b regulates the formation of fear-extinction memory. *Nat Neurosci* 14:1115–1117.
- Lissek S., Glaubitz B., Wolf O. T., Tegenthoff M. (2015). The DA antagonist tiapride impairs context-related extinction learning in a novel context without affecting renewal. *Front Behav Neurosci* 9:238.
- Lukas M., Neumann I. D. (2012). Nasal application of neuropeptide S reduces anxiety and prolongs memory in rats: social versus non-social effects. *Neuropharmacology* 62:398–405.
- Milad M. R., Quirk G. J. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol* 63:129–151.
- Murphy C. P., Li X., Maurer V., Oberhauser M., Gstir R., Wearick-Silva L. E., Viola T. W., Schaffner S., Grassi-Oliveira R., Whittle N., Huttenhofer A., Bredy T. W., Singewald N. (2017). MicroRNA-Mediated Rescue of Fear Extinction Memory by miR-144–3p in Extinction-Impaired Mice. *Biol Psychiatry*.
- Otto M. W., McHugh R. K., Simon N. M., Farach F. J., Worthington J. J., Pollack M. H. (2010). Efficacy of CBT for benzodiazepine discontinuation in patients with panic disorder: Further evaluation. *Behav Res Ther* 48:720–727.
- Otto M. W., Kredlow M. A., Smits J. A., Hofmann S. G., Tolin D. F., de Kleine R. A., van Minnen A., Evins A. E., Pollack M. H. (2016). Enhancement of Psychosocial Treatment With D-Cycloserine: Models, Moderators, and Future Directions. *Biol Psychiatry* 80:274–283.
- Pape H. C., Wotjak C. T. (2013). Neuronal circuits of fear memory and fear extinction. *e-Neuroforum* 4:47–56.
- Pittig A., van den Berg L., Vervliet B. (2016). The key role of extinction learning in anxiety disorders: behavioral strategies to enhance exposure-based treatments. *Curr Opin Psychiatry* 29:39–47.
- Reinscheid R. K., Xu Y. L., Civelli O. (2005). Neuropeptide S: a new player in the modulation of arousal and anxiety. *Mol Interv* 5:42–46.
- Sartori S. B., Maurer V., Murphy C., Schmuckermair C., Muigg P., Neumann I. D., Whittle N., Singewald N. (2016). Combined Neuropeptide S and D-Cycloserine Augmentation Prevents the Return of Fear in Extinction-Impaired Rodents: Advantage of Dual versus Single Drug Approaches. *Int J Neuropsychopharmacol* 19.
- Singewald N., Schmuckermair C., Whittle N., Holmes A., Ressler K. J. (2015). Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacol Ther* 149:150–190.
- Slattery D. A., Naik R. R., Grund T., Yen Y. C., Sartori S. B., Fuchsl A., Finger B. C., Elfving B., Nordemann U., Guerrini R., Calo G., Wegener G., Mathe A. A., Singewald N., Czibere L., Landgraf R., Neumann I. D. (2015). Selective breeding for high anxiety introduces a synonymous SNP that increases neuropeptide S receptor activity. *J Neurosci* 35:4599–4613.
- Tovote P., Fadok J. P., Luthi A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 16:317–331.
- Whittle N., Maurer V., Murphy C., Rainer J., Bindreither D., Hauschild M., Scharinger A., Oberhauser M., Keil T., Brehm C., Valovka

T., Striessnig J., Singewald N. (2016). Enhancing dopaminergic signaling and histone acetylation promotes long-term rescue of deficient fear extinction. *Transl Psychiatry* 6:e974.

Wittchen H. U., Jacobi F., Rehm J., Gustavsson A., Svensson M., Jonsson B., Olesen J., Allgulander C., Alonso J., Faravelli C., Fratiglioni L., Jennum P., Lieb R., Maercker A., van Os J., Preisig M., Salvador-Carulla L., Simon R., Steinhausen H. C. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:655–679.

Article note: German version available at <https://doi.org/10.1515/nf-2017-0011>

Autoreninformationen



Dr. Simone B. Sartori
Institute of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology, Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), Leopold Franzens University Innsbruck, Innrain 80–82, A-6020 Innsbruck, Austria
Mail: simone.sartori@uibk.ac.at

Simone B. Sartori studied pharmacy at the Leopold-Franzens University Innsbruck, Austria. After doing some research at the Department of Pharmacology at Oxford University, UK, she returned to the Institute of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology at the University Innsbruck in 2001 and received her PhD on neurochemical changes in depression-like behaviour with a focus on neuropeptides. Her main interests are novel pharmacological

strategies for treating anxiety disorders and/or depression. She has published over 35 original and review articles. Her scientific work has been awarded with the Dr. Maria-Schaumayer-foundation award and the Science Award of the city of Innsbruck.



Prof. Dr. Nicolas Singewald
Institute of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology, Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), Leopold Franzens University Innsbruck, Innrain 80–82, A-6020 Innsbruck, Austria
Phone: +43-512-507-58802
Fax: +43-512-507-58889
Mail: nicolas.singewald@uibk.ac.at

Nicolas Singewald studied pharmacy at the Leopold-Franzens University Innsbruck and received his PhD from the Institute of Pharmaceutical Chemistry. He then worked as a postdoc at the Institute of Pharmacodynamics and studied central blood pressure regulation, which led to his habilitation in the field of Pharmacology and Toxicology in 1996. As Erwin Schrödinger stipendiary (FWF) he worked at Oxford University (Department of Clinical Pharmacology, Prof. Grahame-Smith), UK from 1998–1999 and studied functional characterization of anxiety-triggering substances in the brain. He then returned to Innsbruck, where he was appointed interim director of the Institute of Pharmacology and Toxicology from 1999–2001. Since 2002 he is head of the group “Neuropharmacology” at the Institute of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology. In the frame of SFB44 (Cell signaling in chronic CNS disorders) and the PhD programme SPIN (Signal processing in neurons) he focuses on analyzing neuronal circuits and neurobiological mechanisms of depression, anxiety- and trauma-associated disorders, as well as on how these findings can be utilised to develop novel therapy strategies for those prevalent CNS disorders.

Übersichtsartikel

Viola Nordström* und Silke Herzer

Veränderung von Membranlipiden schützt vor neuronaler Insulinresistenz in Alzheimer-Modellen

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-0007>

Zusammenfassung: Morbus Alzheimer ist eine degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche durch ein progressives Absterben von Nervenzellen und Synapsen zu schweren Gedächtnis- und Orientierungsstörungen führt. Lösliche β -Amyloid-Oligomere sind eine hoch neurotoxische Vorstufe der bei Alzheimer gebildeten β -Amyloid-Fibrillen. Die Bindung dieser β -Amyloid-Oligomere an synaptische Insulinrezeptoren führt zu einer neuronalen Insulinresistenz und trägt entscheidend zur Verschlechterung der kognitiven Leistung bei.

Insulinrezeptoren befinden sich in der Zellmembran. Diese besteht aus einer Lipiddoppelschicht und weist eine hohe Konzentration von glykosylierten Lipiden, sogenannten Gangliosiden, auf. Ganglioside steuern die Aktivität von Insulinrezeptoren durch dynamische molekulare Interaktionen und begünstigen die durch β -Amyloid-Oligomere ausgelöste Insulinresistenz. Somit kann eine Hemmung der Gangliosidbiosynthese Nervenzellen vor den schädlichen Wirkungen der β -Amyloid-Oligomere schützen.

Schlüsselwörter: Morbus Alzheimer; Insulinresistenz; Ganglioside; Neurodegeneration; Caveolin-1

***Korrespondenzautor:** Viola Nordström, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie/G130, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Deutschland; Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften (IZN), Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Deutschland, E-Mail: v.nordstroem@dkfz.de, Web: www.uni-heidelberg.de/izn/researchgroups/nordstroem/

Silke Herzer, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie/G130, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Deutschland; Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften (IZN), Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Deutschland

Morbus Alzheimer

Bei Morbus Alzheimer, erstmalig von Alois Alzheimer 1906 beschrieben, lassen sich im Gehirn von Alzheimer-Patienten zwei Veränderungen feststellen; senile Plaques bestehend aus Ablagerungen von β -Amyloid ($A\beta$)-Eiweiß außerhalb der Nervenzelle sowie Neurofibrillenbündel, bestehend aus einer Ansammlung von hyperphosphoryliertem Tau-Protein innerhalb der Nervenzelle (Alzheimer, 1907).

Die charakteristischen Amyloid-Plaques entstehen durch Anhäufung und Verklumpung großer Mengen $A\beta$. $A\beta$ entsteht aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP). APP ist ein integrales Membranprotein, welches ubiquitär im Körper gebildet wird (Slunt et al., 1994). An der Zelloberfläche wird APP von zwei membranständigen Enzymen, der β -Sekretase und anschließend der γ -Sekretase (Preseniline-1/-2) zerschnitten und es kommt zur Freisetzung des $A\beta$. Diese $A\beta$ -Fragmente können in ihrer Länge zwischen 35 und 42 Aminosäuren variieren. Im gesunden Organismus wird $A\beta$ nur in geringen Mengen hergestellt und auch sehr schnell wieder vom Körper abgebaut. Bei der Alzheimer – Krankheit besteht jedoch ein Ungleichgewicht. Die $A\beta$ -Produktion wird nicht mehr adäquat reguliert und es kommt insbesondere zu einem Überschuss von $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ im Gehirn. Diese $A\beta$ -Spezies bilden fibrilläre Aggregate ($A\beta$ -Fibrillen), welche verklumpen und sich im extrazellulären Raum zu $A\beta$ -Plaques zusammenlagern (Simons et al., 1996). Therapieansätze, die dem Abbau dieser Plaques dienen sollten, konnten jedoch die Symptome der Erkrankung nicht vermindern (Head et al., 2008). Mehrere Studien belegten zudem, dass es keinen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Plaques und den Symptomen der Krankheit gibt (Bennett, 2006; Katzman et al., 1988). Diese zunächst paradox anmutende Erkenntnis konnte jedoch mithilfe neuerer Studien erklärt werden. Diese weisen darauf hin, dass kleine lösliche Aggregate des $A\beta$ -Peptids, sogenannte $A\beta$ -Oligomere, neurotoxische Eigenschaften besitzen und damit ursächlicher

Auslöser der Symptome von Morbus Alzheimer sein könnten. A β -Oligomere sind eine Vorstufe der A β -Fibrillen. Sie umfassen lösliche A β -Aggregate verschiedener Größen und werden auch unter dem Begriff der ADDLs (Amyloid beta-Derived Diffusible Ligands (Lambert et al., 1998)) zusammengefasst. ADDLs docken an synaptische Verbindungen an und stören dort die Kommunikation zwischen den Neuronen, was zu synaptischen Ausfällen und dadurch zum Untergang der Neurone führt.

In den häufigsten Fällen ist die Ursache für die Erkrankung an Alzheimer nicht bekannt. Diese Fälle werden unter dem Synonym der sporadischen Alzheimer zusammengefasst. Mit zunehmendem Alter erhöht sich das Risiko, an sporadischer Alzheimer zu erkranken. Ebenso gelten Umweltfaktoren, ein ungesunder Lebensstil und bestimmte Vorerkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 2, als mögliche Risikofaktoren. Ein kleiner Prozentsatz (< 1%) aller Alzheimer-Fälle lässt sich auf genetische Faktoren zurückführen, die eine familiäre Häufung aufweisen und auch schon in jüngeren Jahren (< 50 Jahre) auftreten können. Sie werden als familiäre Alzheimer-Erkrankung (familial Alzheimer's Disease (FAD)) bezeichnet und durch Mutationen im APP-Gen oder dem Gen für Präsenilin-1/-2 verursacht. Diese FAD – Mutation macht man sich bei der Generierung von Alzheimer-Mausmodellen zu nutze. Sogenannte 5xFAD – Mäuse tragen sowohl drei verschiedenen humane Mutationen im APP-Gen als auch zwei weitere im Presenilin-1-Gen. In diesen Mäusen ist eine Bildung der A β -Plaques schon nach acht Wochen nachzuweisen und erste kognitive Einschränkungen lassen sich nach neun Monaten feststellen (Oakley et al., 2006).

Der neuronale Insulinrezeptor

Das Peptidhormon Insulin spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutzuckerspiegels. Es wird von der Bauchspeicheldrüse ins Blut sezerniert und gelangt somit in den gesamten Körper. Dort bindet es an Insulinrezeptoren (IR) in der äußeren Lipidmembran der Körperzellen. Durch die Insulinbindung kommt es zu einer Autophosphorylierung und hierdurch zu einer strukturellen Veränderung des IR. In seiner nun aktiven Form kann der IR intrazelluläre Adapterproteine binden, welche im Zellinneren Signalkaskaden aktivieren (Abb. 1). Diese Signale veranlassen die Translokation von Glukose-Transportern (GLUT4) in die Zellmembran, wodurch die Zelle in der Lage ist, Glukose aus dem Blut aufzunehmen und zur Energiegewinnung zu nutzen. Große Mengen an IR sind hauptsächlich in Muskel- und Leberzellen und im Fettgewebe zu finden.

Seit einiger Zeit weiß man jedoch auch, dass IR in vielen Bereichen des Gehirns gebildet werden. Die höchsten Mengen konnten im Hypothalamus, Hippocampus, frontalen Kortex und dem Bulbus Olfactorius nachgewiesen werden (Marks und Eastman, 1990). Ein Großteil der IR ist an den synaptischen Endigungen von Neuronen lokalisiert (Schwartz et al., 1992). Im Unterschied zum peripheren IR weist der neuronale IR ein geringeres Molekulargewicht auf. Ferner wird seine Menge auf der Zelloberfläche durch erhöhte Insulinkonzentrationen nicht herabgesetzt (Heidenreich et al., 1983). Eine der ersten physiologischen Funktionen, die für den neuronalen IR im Hypothalamus gezeigt werden konnte, ist die Kontrolle und Regulation des Energiehaushaltes im Körper. Dazu bindet das aus der Peripherie stammende Insulin an IR – spezifischer Neuronpopulationen im Hypothalamus. Dort verändert es die Aktivität und Feuerrate der Neurone, was im Zusammenspiel mit dem Adipokin Leptin einen direkten Einfluss auf das Essverhalten und den Energieverbrauch des Organismus hat.

Zusätzlich zu der Beeinflussung des Energiestoffwechsels konnten dem Insulin auch neurotrophe Funktionen nachgewiesen werden. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Stimulation von IR-Signalkaskaden einen wichtigen Einfluss auf das Überleben neuronaler Zellen sowie auf das Auswachsen von Neuriten und die Synapsenbildung hat (Chiu und Cline, 2010; Wozniak et al., 1993). Im Speziellen konnte der Einfluss der insulinabhängigen Signaltransduktion auf kognitive Prozesse und Gedächtnisbildung im Hippocampus und präfrontalen Kortex gezeigt werden. Beide Bereiche bilden große Mengen an IR und weisen eine hohe synaptische Plastizität auf. Studien an Ratten zeigten, dass die Inaktivierung der neuronalen IR durch interzerebroventrikuläre Injektion von Streptozotocin zu einer Beeinträchtigung des Lernverhaltens und des Erinnerungsvermögens der Versuchstiere führten (Zhao und Alkon, 2001). In diesem Zusammenhang fand man ebenfalls eine Verringerung der Synaptogenese im Hippocampus (Biessels et al., 1996; Lannert und Hoyer, 1998). Umgekehrt erhöhte sich in Ratten die Expression der IR im Hippocampus, nachdem ihre kognitive Fähigkeiten trainiert wurden.

Wie in der Abb. 1 zu sehen ist, führt die Stimulation der IR zur Aktivierung sowohl des MAP-Kinase//ERK1,2-Signalweges als auch des AKT-Signalweges. Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass der MAP-Kinase//ERK1,2-Signalweg die synaptische Aktivität und die neuronale Verknüpfung unabhängig vom Glukosestoffwechsel fördert. Diese Erkenntnisse rücken den neuronalen IR in den Fokus der Forschung, die es sich zum Ziel gesetzt hat,

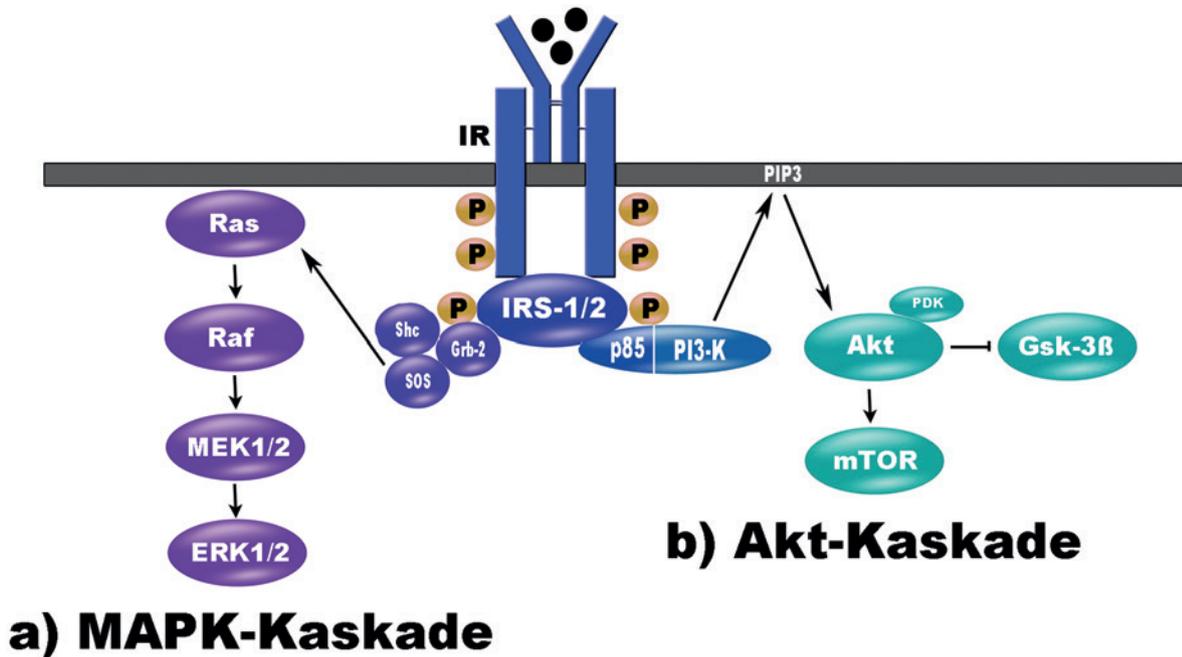


Abb. 1: Insulinrezeptor-Signaltransduktion. Durch Bindung von Insulin an den IR kommt es zur Autophosphorylierung an verschiedenen Tyrosinresten. Dort können anschließend die Adaptermoleküle *Insulin Receptor Substrate-1* (IRS-1) und IRS-2 binden, welche hierdurch aktiviert werden. Abhängig von den Adaptermolekülen können zwei verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden: **a)** Bei der Akt-Kaskade wird durch Interaktion mit IRS-1 die regulatorische Untereinheit der PI-3-Kinase (p85) aktiviert. Diese wiederum katalysiert in der Zellmembran die Generierung von *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate* (PIP3). PIP3 aktiviert die Kinase PDK, welche ihrerseits Akt (*protein kinase B*) phosphoryliert und aktiviert. Dies reguliert Prozesse wie Glukoseaufnahme sowie Protein- und Lipidsynthese. **b)** Bei der zweiten Signalkaskade wird über IRS-1/-2 das Adapterprotein Grb-2 und anschließend mSOS rekrutiert. Dieser Komplex aktiviert die GTPase Ras, wodurch über weitere Kinasen (Raf-1, MEK 1/2) am Ende die MAP-Kinase ERK 1/2 aktiviert wird. Über diesen Signalweg können Wachstum, Differenzierungsprozesse und die Viabilität der Zelle beeinflusst werden (Abb. 1 modifiziert aus Herzer et al., 2016).

dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten bei neurodegenerativen Erkrankungen entgegenzuwirken.

Alzheimer, Neuroinflammation, und neuronale Insulinresistenz

In den vergangenen Jahren sind verschiedene Hypothesen zur Ätiologie und zum Verlauf der sporadischen Alzheimer-Krankheit aufgestellt worden. In diesem Review soll insbesondere auf den Zusammenhang zwischen neuronaler Insulinresistenz und Morbus Alzheimer eingegangen werden.

Adipositas und Diabetes mellitus Typ II stehen im Verdacht, das Risiko für eine spätere Alzheimer-Erkrankung zu erhöhen (Walker und Harrison, 2015). Im Jahr 2012 wurde gezeigt, dass Adipositas und fettreiche Ernährung zu entzündlichen Reaktionen im Gehirn, der sogenannten Neuroinflammation, führt (Thaler et al., 2012). Neuroinflammation zeigt sich sowohl in einer morphologischen

Veränderung der Gliazellen (Astrogliose und Mikrogliose) als auch in einer Erhöhung von Entzündungsmarkern (z. B. TNF- α und IL-1 β). Die 2013 begründete „Inflammation hypothesis of Alzheimer’s disease“ besagt, dass neuroinflammatorische Vorgänge im Gehirn krankhafte Veränderungen der Alzheimer-Krankheit begünstigen (Krstic und Knuesel, 2013). Beispielsweise werden Mikroglia in ihrer physiologischen Funktion gehemmt, Abfallstoffe (z. B. fehlgefaltete oder unzureichend degradierte Proteine) zu beseitigen. Dies führt zu einer Destabilisierung der Synapsen. Neuroinflammation begünstigt ebenfalls die Bildung der neurotoxischen ADDLs im Gehirn. Diese binden an synaptische Transmembranrezeptoren und blockieren deren normale Aktivität. Zudem verursachen ADDLs eine Reduktion der IR an der Nervenzelloberfläche (De Felice et al., 2009). Ein entsprechender Verlust der Insulinsignale führt neben Störungen des Glukosestoffwechsels auch zu Funktionsbeeinträchtigungen der Synapsen und trägt entscheidend zur Degeneration der betroffenen Neurone bei.

Tatsächlich wurden eine verminderte insulinabhängige Signaltransduktion und geringere Mengen an IR in

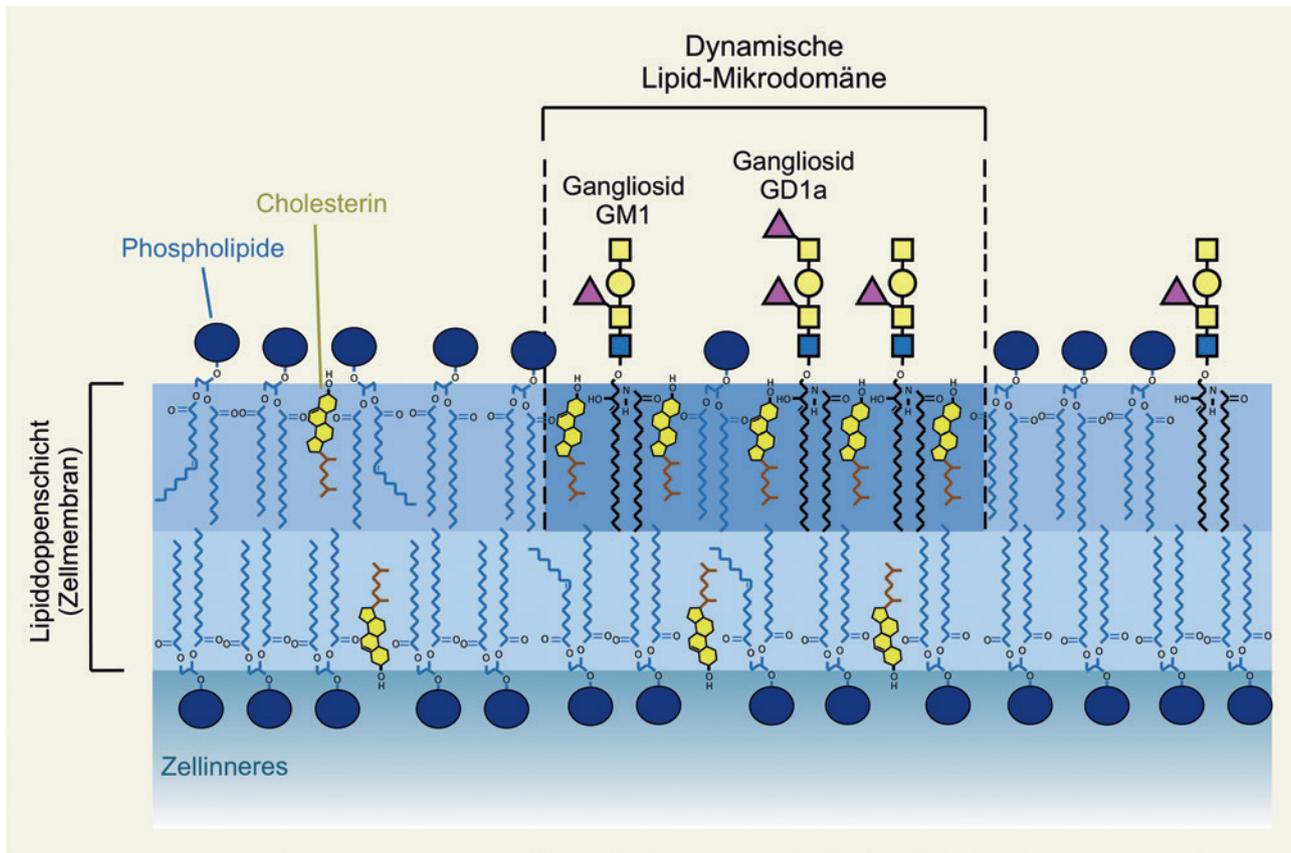


Abb. 2: Schematische Darstellung der neuronalen Zellmembran. Die Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht. Ihre Hauptbestandteile sind Phospholipide und Cholesterin. Spezielle glykosylierte Lipide, die sogenannten Ganglioside, befinden sich im äußeren Teil der Lipiddoppelschicht. Dort sind sie an der Bildung sogenannter dynamischer Lipid-Mikrodomänen beteiligt, welche sich durch einen hohen Anteil an Gangliosiden sowie Cholesterin auszeichnen. Wichtige zelluläre Prozesse, wie beispielsweise Signaltransduktion von Transmembranrezeptoren, finden bevorzugt in Lipid-Mikrodomänen statt.

Gehirnen von Alzheimer-Patienten nachgewiesen (Steen et al., 2005). Der Versuch, diesen Verlust durch intranasale Insulinapplikation bei Alzheimer-Patienten auszugleichen, zeigte in der Tat Verbesserungen im Kurzzeitgedächtnis (Reger et al., 2006), die jedoch nicht über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden konnten. Dies könnte auf die verminderte Insulinsensitivität alzheimerbetroffener Neurone zurückgeführt werden.

Die Lipidzusammensetzung der Nervenzellmembran beeinflusst neben allgemeinen Vorgängen wie der APP-Prozessierung (Clement et al., 2010) auch die Aktivität und Sensitivität von IR (Herzer et al., 2015; Kabayama et al., 2007). Daher haben wir einen neuartigen Forschungsansatz entwickelt, bei dem eine veränderte Lipidzusammensetzung und eine damit einhergehende Erhöhung der Insulinsensitivität die Nervenzellen in verschiedenen Alzheimer-Modellen schützt.

Membranlipide modulieren Nervenzellrezeptoren

Ein bedeutender Teil der Signaltransduktion geht von Transmembranrezeptoren aus, welche die Zellmembran durchspannen. Krankhafte Veränderungen von Transmembranproteinen, wie beispielsweise irreversible Proteinmodifikationen als Konsequenz eines erhöhten oxidativen Stresses, tragen zum Sterben der Nervenzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen bei (Hajieva et al., 2015). Neben prominenten Lipiden (Phospholipide, Cholesterin) befinden sich in der Zellmembran auch sogenannte Glykosphingolipide. Diese besitzen zusätzlich zu ihrem hydrophoben Membrananker eine variable hydrophile Kopfgruppe aus Kohlenhydratresten. Zu den Glykosphingolipiden gehören auch die speziell im Nervensystem gehäuft vorkommenden Ganglioside, die sich im äußeren Teil der Lipiddoppelschicht befinden (Abb. 2, Exkurs 1). Diese spielen eine essenzielle Rolle in der post-

natalen Entwicklung des Gehirns (Jennemann et al., 2005) und modulieren die Aktivität von Transmembranrezeptoren in adulten Neuronen (Nordström et al., 2013).

In Zellmembranen gibt es sogenannte Lipid-Mikrodomänen (Abb. 2). Diese zeichnen sich durch eine hohe Dichte an Sphingolipiden und Cholesterin, aber auch an spezifischen Proteinen wie Caveolin-1 und Transmembranrezeptoren, aus. Innerhalb dieser dynamischen Nanostrukturen finden wichtige Membranprozesse, wie Signaltransduktion, Endo- und Exozytose, statt (Inokuchi, 2010). Ganglioside sind an der Bildung dieser Mikrodomänen beteiligt (Abb. 2). Wir konnten nachweisen, dass Ganglioside die Aktivität und Sensitivität von neuronalen Transmembranrezeptoren durch dynamische molekulare Interaktionen modulieren. In den folgenden Abschnitten beschreiben wir, wie Veränderungen der Gangliosidbiosynthese in Neuronen deren Insulinsensitivität sowie den Krankheitsverlauf in einem Alzheimer-Mausmodell beeinflussen.

Hemmung der Gangliosidbiosynthese erhöht die Insulinsensitivität hippocampaler Neurone

Bereits vor einigen Jahren fand man heraus, dass das Gangliosid GM3 in weißen Fettzellen als natürlicher Hemmstoff der IR fungiert (Kabayama et al., 2007). Entsprechend konnten Fettleber und erhöhte Blutzuckerwerte in adipösen Mäusen erfolgreich durch Hemmung der Gangliosidbiosynthese behandelt werden (Zhao et al., 2009). Im Gegensatz zu Leber- und Fettzellen synthetisieren Neurone jedoch vorwiegend komplexe Ganglioside. Da individuelle Gangliosid-Spezies nicht redundant sind und Rezeptoren auf verschiedene Art regulieren können, musste zunächst untersucht werden, ob eine Verringerung der Ganglioside die Insulinsensitivität von Neuronen erhöhen und diese somit vor der schädlichen Wirkung der ADDLs schützen kann.

In unserer Studie haben wir das Schlüsselenzym der Gangliosidbiosynthese, die Glukosylceramidsynthase (GCS), mithilfe des pharmakologischen Hemmstoffes GENZ-123346 (GENZ) (Richards et al., 2012) in kultivierten hippocampalen Neuronen gehemmt (Abb. 3a). In der Tat zeigt sich eine verstärkte insulinabhängige Signaltransduktion in GENZ-behandelten Neuronen (Herzer et al., 2016). Die spezifische Erhöhung des ERK1/2-Signalweges in GENZ-behandelten Zellen ist insbesondere im Hinblick auf Alzheimer bemerkenswert, da eine erhöhte ERK1/2-Si-

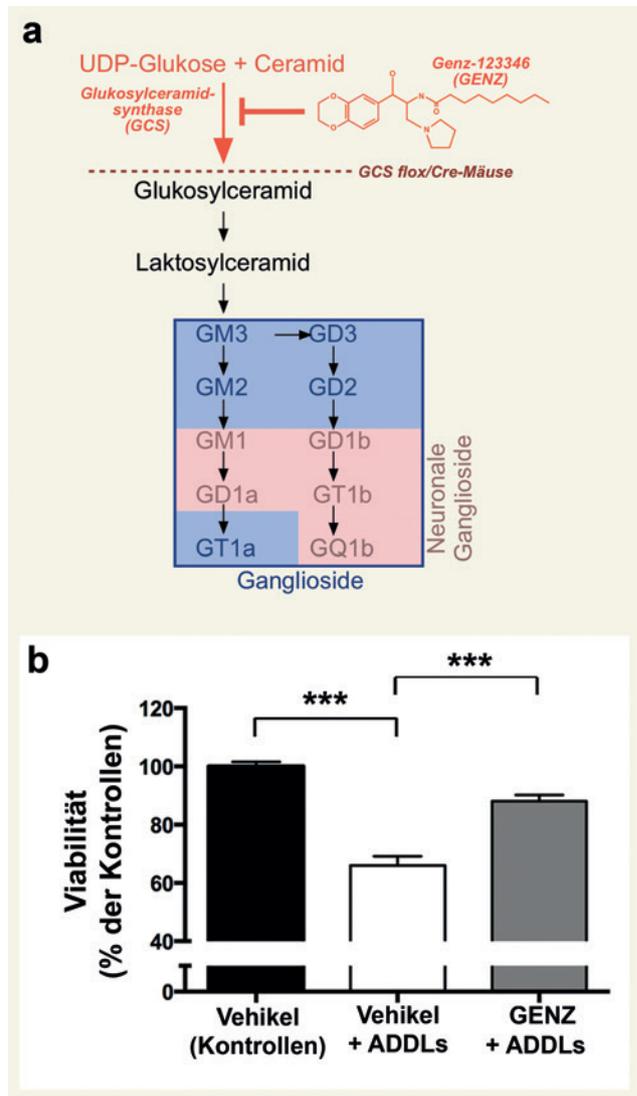


Abb. 3: Hemmung der Gangliosidbiosynthese schützt Neurone vor neurotoxischen β -amyloid-Oligomeren. **a** Das Schlüsselenzym der Gangliosidbiosynthese ist die Glukosylceramidsynthase (GCS). Die Gangliosidbiosynthese kann sowohl pharmakologisch durch das Ceramid-Analogon GENZ als auch genetisch durch zellspezifische Deletion des Allels (GCS flox//Cre-Mäuse) gehemmt werden. Der Promotor, welcher die Expression der Cre-Rekombinase kontrolliert, bestimmt, in welchen Zellen die Gangliosidbiosynthese unterdrückt wird. **b** ADDL-Exposition verringert die Viabilität von Neuronen. GENZ-behandelte Neurone sind jedoch resistenter gegenüber den schädlichen Effekten der ADDLs (Abb. 3.b) modifiziert aus Herzer et al., 2016).

gnaltransduktion das Überleben der Nervenzellen sowie die kognitive Leistungsfähigkeit stimuliert. Interessanterweise zeigt sich jedoch gleichzeitig, dass die GENZ-Behandlung nicht nur die Signaltransduktion, sondern auch die Menge der IR in den Neuronen erhöht (Herzer et al., 2016). Folglich haben wir untersucht, ob eine Hemmung

der Gangliosidbiosynthese und eine damit verbundene Erhöhung der Insulinsensitivität die Neuronen in Alzheimer-Modellen schützen könnte.

Hemmung der Gangliosidbiosynthese schützt Neurone vor dem schädlichen Einfluss der ADDLs

Neuronale Insulinresistenz ist eines der sehr komplexen pathologischen Charakteristika der Alzheimer-Krankheit. Sie führt zu Funktionsstörungen der Synapsen und trägt entscheidend zur Neurodegeneration bei. Neurotoxische ADDLs, die bei Alzheimer gebildet werden, führen zum Verlust der dendritischen IR und somit zu Insulinresistenz (De Felice et al., 2009). Somit ist es ein sehr wichtiges Ziel gewesen, herauszufinden, ob die Hemmung der Gangliosidbiosynthese durch GENZ die hippocampalen Zellkulturen vor ADDLs schützen kann. In der Tat beobachten wir folgende neuroprotektive Effekte der GENZ-Behandlung (Herzer et al., 2016):

Viabilität. Der MTT-Überlebenstest ermittelt die Stoffwechselaktivität von Zellen. Die für diese Reaktion nötige zelluläre Enzymaktivität korreliert mit der Viabilität. ADDLs verringern die Viabilität von kultivierten hippocampalen Neuronen erheblich. Eine vorhergehende GENZ-Behandlung erhöht jedoch die Überlebensrate von Neuronen, die den ADDLs ausgesetzt sind (Abb. 3 b).

IR auf der Zelloberfläche. ADDLs bewirken eine Reduktion der IR an der Nervenzelloberfläche. Dies kann jedoch durch die Hemmung der Gangliosidbiosynthese verhindert werden.

Insulinabhängige Signaltransduktion. Der Verlust der oberflächlichen IR beeinträchtigt die insulinvermittelte Signaltransduktion. Der innovative proximity ligation assay (PLA®, Duolink®) kann phosphorylierte und somit aktive IR in den Dendriten kultivierter Neurone nachweisen (Abb. 4a). Wie auch bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (De Felice et al., 2009), zeigt der PLA®, dass ADDLs die insulinstimulierte Phosphorylierung dendritischer IR vermindern. Dieser schädliche Effekt kann jedoch durch GENZ verhindert werden (Abb. 4b).

Caveolin-1-Verringerung durch GENZ stabilisiert die IR auf der Nervenzelloberfläche

Die aus dem Protein Caveolin-1 geformten Caveolae sind spezielle Mikrodomänen in der Zellmembran, in denen Endozytose stattfindet. In Caveolae befinden sich zudem hohe Mengen an Cholesterin sowie Sphingolipiden. Interessanterweise weisen gangliosiddefiziente Neurone deutlich weniger Caveolin-1 und eine entsprechend verringerte Zahl an Caveolae auf (Herzer et al., 2016).

Nach Ligandenbindung werden IR sowohl in clathrinbeschichteten Vesikeln als auch in Caveolae endozytiert. Somit reguliert Caveolin-1 die Menge an IR auf der Zelloberfläche. Da der Caveolin-1-Gehalt im Gehirn von Alzheimer-Patienten erhöht ist (Gaudreault et al., 2004), wird den Caveolae eine potenziell entscheidende Bedeutung bei der Krankheitsentstehung zugemessen. Mithilfe des PLA® können wir erstmalig direkt zeigen, dass ADDLs die molekularen Interaktionen zwischen *a) Caveolin-1 und Gangliosid GD1a*, *b) IR und GD1a*, sowie *c) IR und Caveolin-1*, signifikant verstärken. In gangliosiddefizienten Neuronen finden sich hingegen weniger Interaktionen zwischen IR und Caveolin-1. Wir vermuten, dass gangliosidinduzierte IR/Caveolin-1-Interaktionen für die IR-Endozytose notwendig sind (Herzer et al., 2016).

Somit postulieren wir einen neuartigen molekularen Mechanismus, bei dem Ganglioside in der Nervenzellmembran alzheimerinduzierte Insulinresistenz durch Stimulation der Expression von Caveolin-1 und molekularer Interaktionen mit IR begünstigen. Eine Hemmung der GCS und damit die Reduktion der Caveolae stabilisieren die IR in Neuronen, welche den neurotoxischen ADDLs ausgesetzt sind (Abb. 5).

Hemmung der Gangliosidbiosynthese schützt auch in einem Alzheimer-Mausmodell vor Neurodegeneration

In Neuronen adulter Alzheimer-Mäuse (5xFAD-Mäuse; Exkurs 2) kann die GCS und somit die Gangliosidbiosynthese gehemmt werden. Tatsächlich weisen diese Tiere eine geringere Neurodegeneration im zerebralen Kortex auf, trotzdem der Gehalt der Amyloid-Plaques nicht reduziert ist. Des Weiteren schützt die GCS-Deletion die Alzheimer-Mäuse vor einem Verlust neuronaler IR im Kortex.

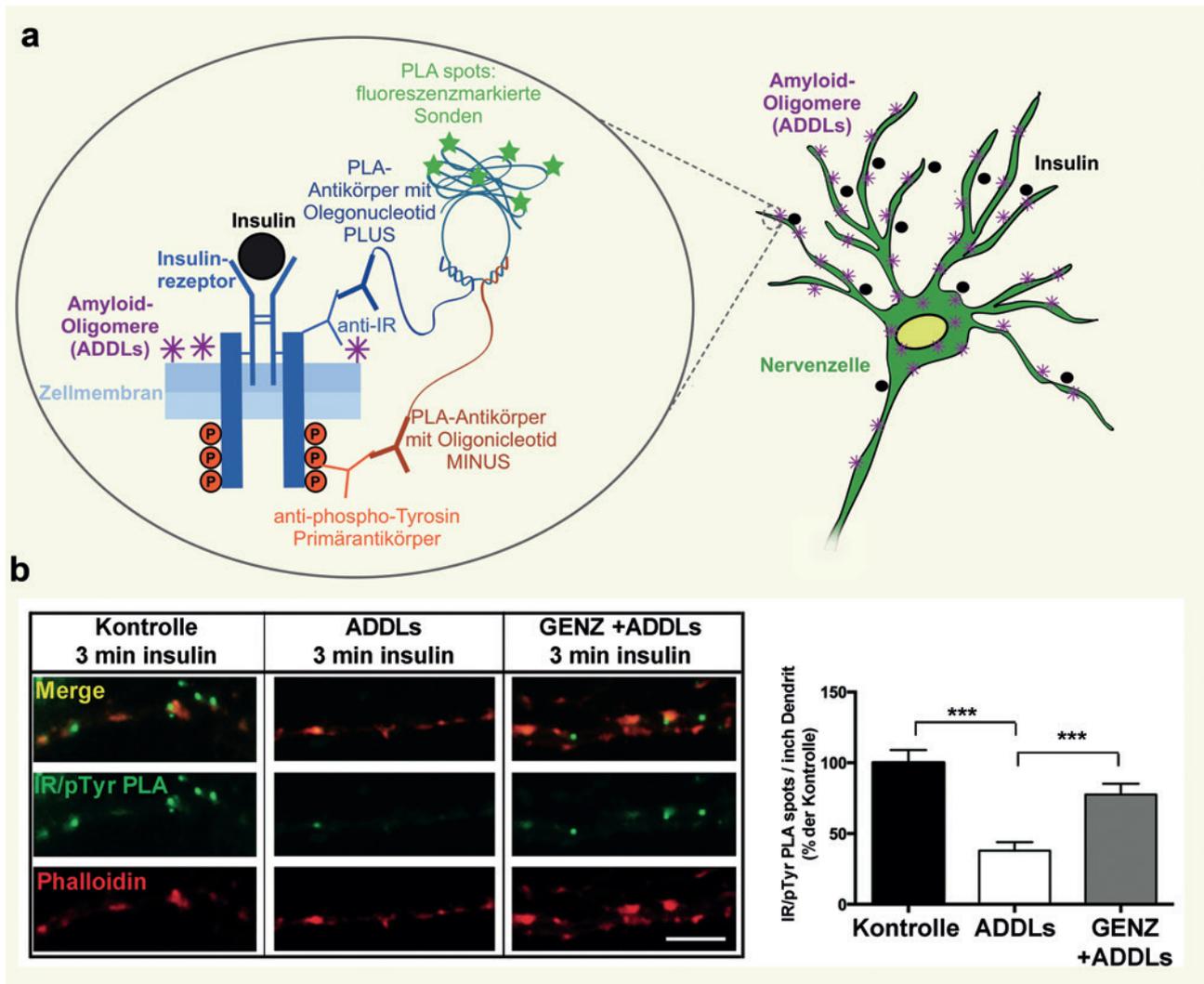


Abb. 4: Erhöhte Insulinsensitivität von GENZ-behandelten Neuronen im Alzheimer-Modell. **a** Molekulare Interaktionen können durch die innovative Technik proximity ligation assay (PLA®) sichtbar gemacht werden. Der PLA® ermöglicht die Detektion von Interaktionspartnern durch Antikörper zweier verschiedener Spezies sowie durch oligonukleotidgekoppelte PLA®-Sekundärantikörper. Die Adapter-Oligonukleotide werden ligiert und bilden eine Matrize für die anschließende „Rolling-Circle Amplifikation“. Das entstehende Amplifikat wird mit einer fluoreszenzkonjugierten Sonde sichtbar gemacht. Phosphorylierte und somit aktive IR in neuronalen Dendriten können mit PLA® spezifisch nachgewiesen werden. **b** In einem Alzheimer-Modell werden kultivierte Neurone den neurotoxischen A β -Oligomeren (ADDLs) ausgesetzt. Der PLA® zeigt einen Rückgang der insulinstimulierten IR-Phosphorylierung nach ADDL-Exposition. Die Hemmung der Gangliosidbiosynthese durch GENZ hingegen erhält die Insulinsensitivität von Nervenzellen, die den ADDLs ausgesetzt sind (Abb. 4.b) modifiziert aus Herzer et al., 2016).

Unsere Hypothese besagt, dass Ganglioside die A β -induzierte Internalisierung des IRs in Caveolae fördern. In der Tat zeigt sich, dass alzheimerbedingte molekulare Interaktionen zwischen Caveolin-1 und IR durch GCS-Deletion verhindert werden können (Herzer et al., 2016). Somit haben sich grundlegende Beobachtungen aus unseren Zellkulturarbeiten, nach denen die Hemmung der Gangliosidbiosynthese neuroprotektiv wirkt, in einem Alzheimer-Mausmodell bestätigt.

Ausblick

Seit vielen Jahren wird vermutet, dass Membranlipide nicht nur eine mechanische Barriere darstellen, sondern sowohl aktiv in die Modulation von Signaltransduktionsprozessen eingreifen als auch Prozesse bei neurodegenerativen Erkrankungen beeinflussen können. Spezifisch in Bezug auf Alzheimer wurde bereits gezeigt, dass die Membranfluidität, welche durch die Lipidzusammensetzung der Membran bestimmt wird, Vorgänge wie die APP-

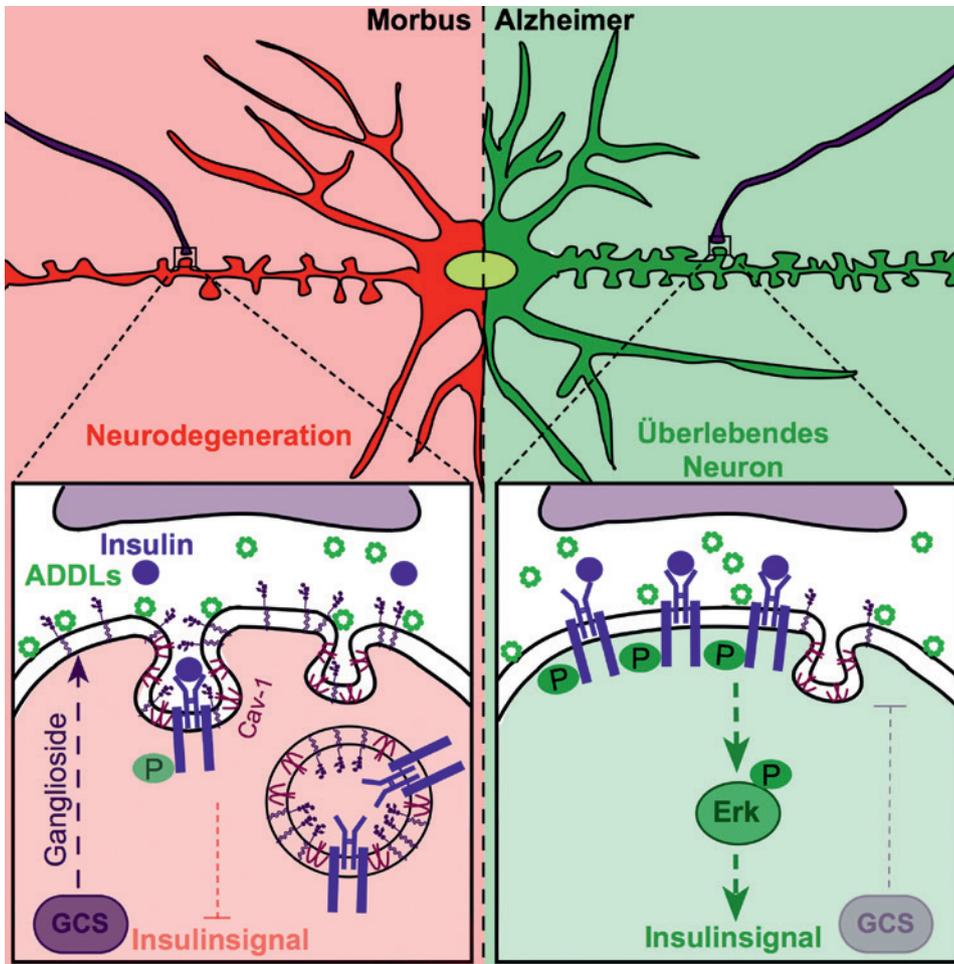


Abb. 5: Hemmung der Gangliosidbiosynthese schützt vor alzheimerinduzierter Neurodegeneration und Insulinresistenz. Die Ergebnisse legen nahe, dass Ganglioside die β -induzierte Endozytose der IR in Caveolae und somit Insulinresistenz und Neurodegeneration begünstigen (linkes Schema). Die Hemmung der GCS hingegen verringert die Caveolin-1-Mengen und erhöht die Überlebensrate neuronaler Zellen sowie deren Insulinsensitivität in einem Alzheimer-Modell (rechtes Schema). Es wird vermutet, dass die Hemmung der GCS ebenso zur höheren Überlebensrate von gangliosiddefizienten Neuronen in Alzheimer-Mäusen beiträgt (Abb. 5. modifiziert aus Herzer et al., 2016).

Prozessierung beeinflusst (Clement et al., 2010). Unsere Ergebnisse begründen nun eine weitere Hypothese, die besagt, dass Ganglioside in der Zellmembran die ADDL-induzierte neuronale Insulinresistenz und, als Konsequenz, die Neurodegeneration begünstigen können. Dies bedeutet in erweiterter Konsequenz, dass die neuronale Gangliosidbiosynthese potenziell eine entscheidende Rolle im Verlauf der Alzheimer-Krankheit spielen könnte. Die Hemmung des Schlüsselenzyms der Gangliosidbiosynthese, der GCS, könnte somit ein neues potenzielles therapeutisches Ziel für die Bekämpfung der Alzheimer-Krankheit darstellen. In dieser Hinsicht wird es am wichtigsten sein, zu erforschen, ob die Hemmung der GCS einen Effekt auf das kognitive Leistungsvermögen von betroffenen Tieren haben wird.

Hingegen bedarf diese Hypothese einer weiteren empirischen Untermauerung durch zielgerichtete experimentelle Studien. Ein mögliches therapeutisches Potenzial von GCS-Hemmstoffen wie GENZ muss beispielsweise im Detail in weiteren Tiermodellen, speziell der sporadischen Alzheimer-Krankheit, evaluiert werden.

Dabei spielen auch weitere Zelltypen im Gehirn, speziell die Gliazellen, eine wichtige Rolle. Diesen Zellen wird ebenfalls eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung und dem Verlauf von Morbus Alzheimer zugemessen. Neuroinflammatorische Veränderungen hervorgerufen durch Astrozyten und Mikroglia stehen im Verdacht, die sporadische Alzheimer-Erkrankung zu begünstigen, wenn nicht gar auszulösen. Somit wird es ein entscheidendes Ziel sein, herauszufinden, inwiefern Ganglioside in diesen Zelltypen zur Entstehung der Neuroinflammation

tion beitragen. Dies kann durch eine Kombination aus *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen mit Hemmung der GCS in Astrozyten oder Mikroglia erfolgen. Zunächst müssen die Morphologie der Gliazellen sowie kognitive Funktionen und Nervenzellverbindungen in betroffenen Mäusen mit GCS-Hemmung in Gliazellen untersucht werden. Dies wäre ein erster Schritt, um herauszufinden, ob Ganglioside Neuroinflammation und Neurodegeneration bei Alzheimer beeinflussen.

Exkurs 1: Ganglioside

Ganglioside sind Lipide mit einer spezifischen chemischen Struktur, die in der äußeren Schicht der Zellmembran vorkommen. Sie wurden 1942 erstmalig von Ernst Klenk aus Gehirngewebe isoliert und erhielten den Namen „Ganglioside“. Neben ihrem sehr hohen Vorkommen im Gehirn werden Ganglioside in nahezu allen Zellen des Körpers gebildet. Sie tragen zur Bildung dynamischer Mikrodomänen in Zellmembranen bei, in denen sie die Aktivität von Transmembranrezeptoren modulieren. Ganglioside besitzen einen hydrophoben Ceramidanker und eine hydrophile Kopfgruppe bestehend aus einer Kette von Kohlenhydratresten. Dabei besitzen Ganglioside typischerweise mindestens einen oder mehrere Sialinsäurereste in der Kopfgruppe. Das Schlüsselenzym der Gangliosidbiosynthese ist die Glucosylceramidsynthase (GCS), welche die Addition eines aktivierten Glukosylrestes an das Ceramid katalysiert. Die weitere Addition eines Galaktosylrestes führt schließlich zur Bildung des allgemeinen Gangliosidvorläufermoleküls Lactosylceramid. Durch die sequenzielle Aktivität weiterer Enzyme werden weitere Zuckerreste an das Lactosylceramid angefügt. Dies führt zur Bildung verschiedener Arten von Gangliosiden, welche sich somit durch ihre individuellen Kopfgruppen unterscheiden. Verschiedene Zelltypen weisen unterschiedliche Gangliosid-Expressionsmuster auf. In Nervenzellen befinden sich hohe Konzentrationen der komplexen Ganglioside GM1, GD1a, GD1b, GT1b, und GQ1b, wohingegen Astrozyten hauptsächlich Ganglioside mit einfachen Strukturen, wie GM3 und GD3, bilden.

Exkurs 2: Gangliosiddefiziente Alzheimer-Mäuse

Die Gangliosidbiosynthese kann durch Deletion des Schlüsselenzyms Glucosylceramidsynthase (GCS; Gen:

Ugcg) zellspezifisch gehemmt werden (Jennemann et al., 2005). Dies geschieht mithilfe des sogenannten Cre-LoxP-Systems, mit welchem gezielt Sequenzen markiert („gefloxht“) und aus der DNA herausgeschnitten werden können. Der Promoter, der die Expression der Cre-Rekombinase kontrolliert, bestimmt die Zellen, in denen die Rekombinase aktiv sein soll. Mäuse mit „gefloxhten“ *Ugcg*-Allelen werden demnach mit Tieren gekreuzt, die das schneidende Enzym Cre-Rekombinase spezifisch in Neuronen des Vorderhirnes, bilden (Nordström et al., 2013). Da die Cre-Expression bei diesen Tieren durch die Gabe von Tamoxifen erst induziert wird, kann die Gangliosidbiosynthese in adulten Neuronen gehemmt werden. Diese Tiere werden schließlich mit einem gängigen Mausmodell für Alzheimer, den 5xFAD-Mäusen (Oakley et al., 2006), gekreuzt, die eine progrediente Alzheimer-Erkrankung mit Amyloid-Ablagerungen und Neurodegeneration ab einem Alter von drei Monaten aufweisen.

Danksagung: Unsere Arbeit wird unterstützt von der Alzheimer Forschung Initiative e. V. und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-Grants NO-1107/1-1 und HE-7978/1-1).

Literatur

- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeits. Psychiat. Psych. Med.* 64, 146–148.
- Bennett, D. A. (2006). Postmortem indices linking risk factors to cognition: results from the Religious Order Study and the Memory and Aging Project. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 20, S63-8.
- Biessels, G. J., Kamal, A., Ramakers, G. M., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W. and Gispen, W. H. (1996). Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 45, 1259–1266.
- Chiu, S.-L. and Cline, H. T. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* 5, 7.
- Clement, A. B., Gimpl, G. and Behl, C. (2010). Oxidative stress resistance in hippocampal cells is associated with altered membrane fluidity and enhanced nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1236–1241.
- De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K. L., Zhao, W.-Q., Ferreira, S. T. and Klein, W. L. (2009). Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Aβ oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1971–1976.
- Gaudreault, S. B., Dea, D. and Poirier, J. (2004). Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging* 25, 753–759.

- Hajieva, P., Bayatti, N., Granold, M., Behl, C. and Moosmann, B. (2015). Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. *J. Neurochem.* 133, 352–367.
- Head, E., Pop, V., Vasilevko, V., Hill, M., Saing, T., Sarsoza, F., Nistor, M., Christie, L.-A., Milton, S., Glabe, C., et al. (2008). A two-year study with fibrillar beta-amyloid (Abeta) immunization in aged canines: effects on cognitive function and brain Abeta. *J. Neurosci.* 28, 3555–3566.
- Heidenreich, K. A., Zahniser, N. R., Berhanu, P., Brandenburg, D. and Olefsky, J. M. (1983). Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. *J. Biol. Chem.* 258, 8527–8530.
- Herzer, S., Meldner, S., Gröne, H.-J. and Nordström, V. (2015). Fasting-induced lipolysis and hypothalamic insulin signaling are regulated by neuronal glucosylceramide synthase. *Diabetes* 64, 3363–3376.
- Herzer, S., Meldner, S., Rehder, K., Gröne, H.-J. and Nordström, V. (2016). Lipid microdomain modification sustains neuronal viability in models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 4.
- Inokuchi, J. (2010). Membrane microdomains and insulin resistance. *FEBS Lett.* 584, 1864–1871.
- Jennemann, R., Sandhoff, R., Wang, S., Kiss, E., Gretz, N., Zuliani, C., Martin-Villalba, A., Jäger, R., Schorle, H., Kenzelmann, M., et al. (2005). Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12459–12464.
- Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y. and Inokuchi, J. (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13678–13683.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X. and Peck, A. (1988). Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* 23, 138–144.
- Krstic, D. and Knuesel, I. (2013). Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 25–34.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6448–6453.
- Lannert, H. and Hoyer, S. (1998). Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.* 112, 1199–1208.
- Marks, J. L. and Eastman, C. J. (1990). Ontogeny of insulin binding in different regions of the rat brain. *Dev. Neurosci.* 12, 349–358.
- Nordström, V., Willershäuser, M., Herzer, S., Rozman, J., von Bohlen Und Halbach, O., Meldner, S., Rothermel, U., Kaden, S., Roth, F. C., Waldeck, C., et al. (2013). Neuronal expression of glucosylceramide synthase in central nervous system regulates body weight and energy homeostasis. *PLoS Biol.* 11, e1001506.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* 26, 10129–10140.
- Reger, M. A., Watson, G. S., Frey, W. H., Baker, L. D., Cholerton, B., Keeling, M. L., Belongia, D. A., Fishel, M. A., Plymate, S. R., Schellenberg, G. D., et al. (2006). Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol. Aging* 27, 451–458.
- Richards, S., Larson, C. J., Koltun, E. S., Hanel, A., Chan, V., Nachtigall, J., Harrison, A., Aay, N., Du, H., Arcalas, A., et al. (2012). Discovery and Characterization of an Inhibitor of Glucosylceramide Synthase.
- Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C. and Porte, D. (1992). Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocr. Rev.* 13, 387–414.
- Simons, M., de Strooper, B., Multhaup, G., Tienari, P. J., Dotti, C. G. and Beyreuther, K. (1996). Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 16, 899–908.
- Slunt, H. H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A. C., Tanzi, R. E. and Sisodia, S. S. (1994). Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J. Biol. Chem.* 269, 2637–2644.
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R. and de la Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers. Dis.* 7, 63–80.
- Thaler, J. P., Yi, C.-X., Schur, E. A., Guyenet, S. J., Hwang, B. H., Dietrich, M. O., Zhao, X., Sarraf, D. A., Izgur, V., Maravilla, K. R., et al. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 153–162.
- Walker, J. M. and Harrison, F. E. (2015). Shared neuropathological characteristics of obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease: Impacts on cognitive decline. *Nutrients* 7, 7332–7357.
- Wozniak, M., Rydzewski, B., Baker, S. P. and Raizada, M. K. (1993). The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 22, 1–10.
- Zhao, W. Q. and Alkon, D. L. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol. Cell. Endocrinol.* 177, 125–134.
- Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I.-H., Zhang, J., Maniatis, P., Pacheco, J., Piepenhagen, P., Copeland, D., Arbeen, C., Shayman, J. a, et al. (2009). Inhibiting glycosphingolipid synthesis ameliorates hepatic steatosis in obese mice. *Hepatology* 50, 85–93.

Anmerkung: Übersetzung der englischen Version des Artikels online verfügbar unter <https://doi.org/10.1515/nf-2017-A007>

Autoreninformationen



Dr. rer. nat. Viola Nordström

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie/G130, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Deutschland; Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften (IZN), Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Deutschland
E-Mail: v.nordstroem@dkfz.de
Web: www.uni-heidelberg.de/izn/researchgroups/nordstroem/

Dr. Viola Nordström (geb. 1981) studierte Biologie an der Universität Göttingen sowie an der Universität Lund in Schweden und promovierte 2010 am DKFZ in Heidelberg. Seit 2010 arbeitet sie als Wissenschaftlerin und seit 2012 als Projektgruppenleiterin in der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie am DKFZ Heidelberg (Prof. Dr. H. J. Gröne). Seit 2013 ist ihre Arbeitsgruppe assoziiert mit dem Interdisziplinären Zentrum für Neurowissenschaften (IZN) der Universität Heidelberg. Im Jahr 2015 erhielt sie den Erwin-Niehaus-Preis der Erwin-Niehaus-Stiftung und der Alzheimer Forschung Initiative e. V. für ihr Alzheimer-Forschungsprojekt.



Dr. rer. nat. Silke Herzer

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie/G130, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Deutschland; Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften (IZN), Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Deutschland

Dr. Silke Herzer (geb. 1982) studierte Biologie an der Universität Heidelberg und am Karolinska Institut in Stockholm/Schweden (Prof. Björn Meister) und promovierte 2016 am DKFZ in Heidelberg. Seit 2016 arbeitet sie als Wissenschaftlerin in der Arbeitsgruppe von Dr. Viola Nordström, die in der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie (Prof. Dr. H. J. Gröne) am DKFZ Heidelberg lokalisiert ist.

Viola Nordström* and Silke Herzer

Modification of membrane lipids protects neurons against insulin resistance in models of Alzheimer's disease

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-A007>

Abstract: Alzheimer's disease is a degenerative disease of the central nervous system, which leads to severe deficits in memory and orientation by a progressive loss of neurons and synapses. Soluble β -amyloid oligomers are highly neurotoxic precursors of β -amyloid fibrils that accumulate in Alzheimer's disease. Binding of β -amyloid oligomers to synaptic insulin receptors leads to neuronal insulin resistance, which significantly contributes to cognitive impairments.

Insulin receptors are located in the cell membrane, which consists of a lipid bilayer and contains high amounts of glycosylated lipids, the so-called gangliosides. Gangliosides regulate insulin receptor activity via dynamic molecular interactions and facilitate the β -amyloid oligomer-induced insulin resistance. Thus, inhibiting ganglioside biosynthesis can protect neurons from the detrimental effects of β -amyloid oligomers.

Keywords: Alzheimer's disease, insulin resistance, gangliosides, neurodegeneration, caveolin-1

Alzheimer's disease

Alzheimer's disease, which was initially described by Alois Alzheimer in 1906, is characterized by two pathological changes in the brain; senile plaques, consisting of β -amyloid (A β) peptides, are found outside the neurons and neurofibrillary tangles, consisting of hyperphosphorylated tau protein, are found inside the neurons (Alzheimer, 1907).

phorylated tau protein, are found inside the neurons (Alzheimer, 1907).

Amyloid plaques are built up by large amounts of accumulated and aggregated A β . A β is generated from the amyloid precursor protein (APP). APP is an integral membrane protein that is ubiquitously expressed throughout the body (Slunt et al., 1994). The sequential cleavage of APP by membrane-bound β - and γ -secretases (presenilins 1/2) gives rise to A β fragments. These fragments display variable sizes, ranging from 35 to 42 amino acids. Under physiological conditions, only very low amounts of A β are produced and they are rapidly cleared. In the case of Alzheimer's disease, A β production is no longer appropriately regulated and leads to an accumulation of specifically A β_{40} and A β_{42} in the brain. A β_{40} and A β_{42} are prone to form aggregating A β fibrils, which are subsequently deposited in the form of A β plaques in the extracellular space (Simons et al., 1996). Therapeutic efforts aiming at diminishing the plaque load were not able to ameliorate the symptoms of Alzheimer's disease (Head et al., 2008). In this respect, several studies demonstrated that there is no direct correlation between the occurrence of A β plaques and the severity of disease symptoms (Bennett, 2006; Katzman et al., 1988). However, researchers have been able to explain these seemingly paradoxical findings. Current results indicate that small soluble oligomeric A β aggregates are highly neurotoxic and may therefore be causative for the onset of Alzheimer's disease symptoms. Oligomeric A β aggregates are precursors of A β fibrils and comprise soluble aggregates of variable sizes, termed amyloid- β -derived diffusible ligands (ADDLs) (Lambert et al., 1998). ADDLs bind to synapses, where they interfere with the transmission of information, ultimately leading to synaptic dysfunction and neurodegeneration.

What causes the majority of the Alzheimer's disease cases is not known. These are therefore termed "sporadic Alzheimer's disease". The risk of developing sporadic Alzheimer's disease increases with age. Moreover, environmental factors, an unhealthy lifestyle and certain pre-existing conditions, such as type 2 diabetes, are considered potential risk factors for sporadic Alzheimer's disease. In a minority of cases (less than 1%), however, inheritable

*Corresponding author: Viola Nordström, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie/G130, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany; Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften (IZN), Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Germany, Mail: v.nordstroem@dkfz.de, Web: <http://www.uni-heidelberg.de/izn/researchgroups/nordstroem/>

Silke Herzer, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie/G130, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany; Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften (IZN), Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Germany

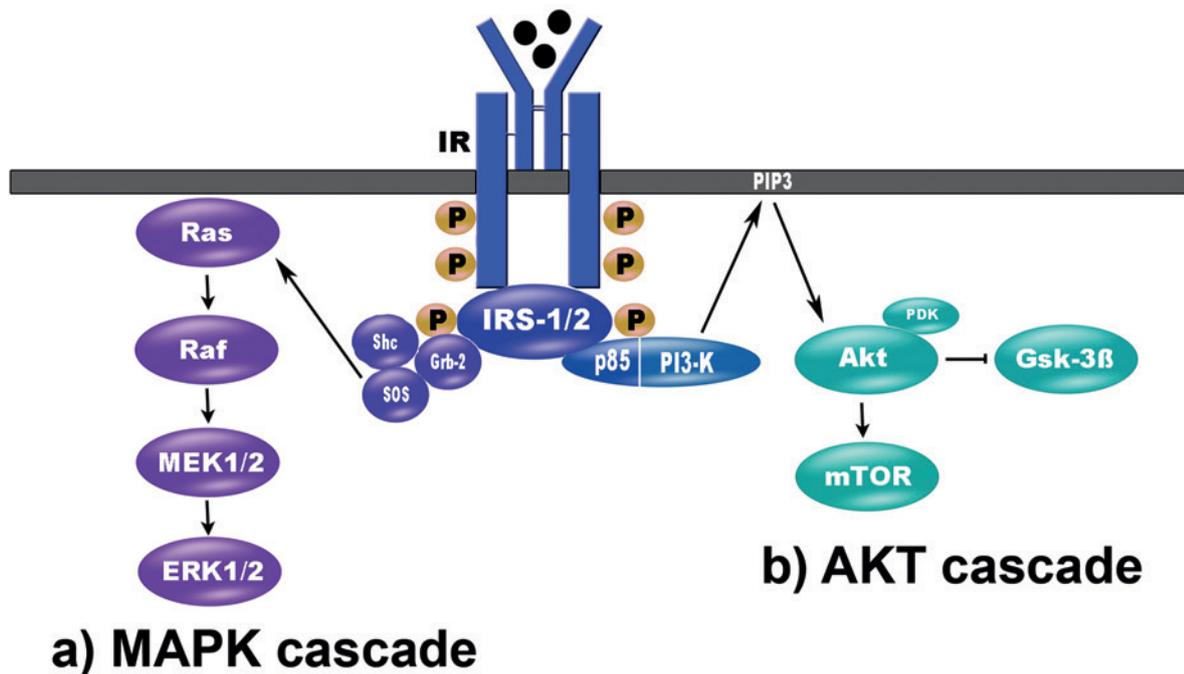


Fig. 1: Insulin receptor signal transduction. Binding of insulin to the IR induces auto-phosphorylation at various tyrosine residues. Subsequently, adapter molecules (insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and IRS-2) are activated by binding to the autophosphorylated IR. Two different signaling cascades can be elicited depending on the adapter molecules: **a)** AKT pathway: The regulatory sub-unit of PI-3-kinase (p85) is activated by interacting with IRS-1 and catalyzes the formation of *phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate* (PIP3). Subsequently, PIP3 activates the kinase PKD, which in turn phosphorylates and activates AKT (*protein kinase B*). This pathway regulates processes such as glucose uptake as well as protein and lipid biosynthesis. **b)** MAP-kinase ERK1/2 pathway: In this case, the adapter proteins Grb-2 and mSOS are recruited by IRS-1 and IRS-2. This complex activates the GTPase Ras and, subsequently, further kinases (Raf-1, MEK 1/2). Finally, MAP-kinase ERK1/2 is activated. This signaling pathway regulates cell growth, cell differentiation, and cell viability. (Fig. 1 modified from Herzer et al., 2016).

genetic mutations are known to elicit an aggressive and early-onset disease variant, termed familial Alzheimer's disease (FAD). FAD is caused by various mutations in the genes encoding either APP or presenilin 1/2. Alzheimer's disease mouse models have been generated with the help of these FAD mutations. So-called 5xFAD mice harbor three different mutations in the APP gene and two mutations in the presenilin-1 gene. These mice display a rapid onset of β -amyloid plaque accumulation at the age of 8 weeks as well as cognitive impairments at the age of 9 months (Oakley et al., 2006).

The neuronal insulin receptor

The peptide hormone insulin plays an important role in blood glucose regulation. It is secreted by the pancreas and distributed by the blood stream throughout the body. Insulin binds to insulin receptors (IR) located in plasma cell membranes. Insulin binding induces IR auto-phos-

phorylation and a change in conformation. In its active form, the IR is able to recruit and bind intracellular adapter molecules that activate further intracellular signaling cascades (Fig. 1). These signals induce the translocation of glucose transporters (GLUT4) into the cell membrane and thus enable the cell to utilize glucose for energy generation. Liver and muscle cells as well as adipocytes express high amounts of IR.

It has been known for a long time that IR are also expressed in various areas of the brain. Among the regions displaying the highest IR expression are the hypothalamus, the hippocampus, the frontal cortex, and the olfactory bulbs (Marks and Eastman, 1990). The bigger part of the IR is expressed at synaptic terminals (Schwartz et al., 1992). The neuronal IR has a lower molecular weight than the peripheral IR. Moreover, in contrast to the peripheral IR, increasing concentrations of insulin do not decrease neuronal IR levels on the cell surface (Heidenreich et al., 1983). One of the initial physiological functions that was described for the neuronal IR was the regulation of energy homeostasis and body weight. In order to accomplish this,

peripheral insulin binds to IR present in specific hypothalamic neuronal populations and, in conjunction with the adipokine leptin, adjusts the neuronal activity as well as the neuronal firing rate. This in turn directly influences the feeding behavior and the energy expenditure of the body.

In addition to the regulation of body energy homeostasis, the IR also exerts neurotrophic functions. Several studies have demonstrated that IR signaling stimulates neuronal survival as well as axonal growth and synapse formation (Chiu and Cline, 2010; Wozniak et al., 1993). Specifically, they have shown an IR signal-dependent stimulation of cognitive processes and memory formation in the hippocampus and the prefrontal cortex. These brain regions express large amounts of IR and display high synaptic plasticity. Experiments in rats showed that an inactivation of the neuronal IR by intracerebroventricular injection of streptozotocin leads to impairments in learning and memory formation (Zhao and Alkon, 2001). In line with this, synaptogenesis in the hippocampus was also reduced (Biessels et al., 1996; Lannert and Hoyer, 1998). Conversely, cognitive training increased IR expression in the hippocampus of rats.

As shown in Fig. 1, IR stimulation activates both the MAP-kinase/ERK1,2 and the AKT pathways. Research findings indicate that particularly the MAP-kinase/ERK1,2-dependent signaling stimulates synaptic function and neuronal wiring, independent of glucose regulation. These results have put the neuronal IR into the focus of researchers who intend to counteract the cognitive decline that accompanies neurodegenerative diseases.

Alzheimer's disease, neuroinflammation, and neuronal insulin resistance

In recent years, several hypotheses about the etiology and progression of sporadic Alzheimer's disease have been put forward. This review will mainly cover the connections between neuronal insulin resistance and Alzheimer's disease.

Obesity and type 2 diabetes are suspected to increase the risk of developing Alzheimer's disease (Walker and Harrison, 2015). In 2012, researchers showed that obesity and high fat diet elicit neuroinflammation (Thaler et al., 2012). Characteristic hallmarks of neuroinflammation are morphological changes of glial cells (astrogliosis and microgliosis) as well as increases in pro-inflammatory

cytokines (e.g. TNF- α and IL-1 β). In 2013, the "inflammation hypothesis of Alzheimer's disease" was put forward, suggesting that neuroinflammatory processes in the brain facilitate pathophysiological changes typical of Alzheimer's disease (Krstic and Knuesel, 2013). For example, neuroinflammation disturbs the physiological microglial function to an extent that these cells are no longer able to appropriately clear cellular debris, including misfolded or inadequately degraded proteins. This leads to synaptic destabilization. Moreover, neuroinflammation triggers the generation of neurotoxic ADDLs in the brain. ADDL binding to synaptic transmembrane receptors interferes with their physiological activity. Additionally, ADDLs promote IR loss from the neuronal cell surface (De Felice et al., 2009). Besides disturbing the cell's glucose homeostasis, a loss of insulin signaling also reduces synaptic function and promotes the degeneration of affected neurons.

In fact, lower insulin-dependent signaling and reduced IR levels were found in brains of Alzheimer's disease patients (Steen et al., 2005). A therapeutic approach to counterbalance the loss of IR signaling by intranasal application of insulin indeed improved the short-term memory (Reger et al., 2006). However, it was not possible to maintain these improvements for a longer period, perhaps due to a decreased insulin sensitivity in the affected neurons.

Besides more general processes such as APP cleavage (Clement et al., 2010), the lipid composition of the neuronal membrane affects IR activity and sensitivity (Herzer et al., 2015; Kabayama et al., 2007). Thus, we have developed a novel research approach by showing that an altered membrane lipid composition and a concomitant increase of neuronal insulin sensitivity can protect neurons in various models of Alzheimer's disease.

Membrane lipids modulate neuronal receptors

A major part of the cellular signal transduction originates at transmembrane receptors embedded in the plasma cell membrane. Pathological changes in transmembrane proteins, such as irreversible protein modifications due to increased oxidative stress, contribute to cell death in neurodegenerative diseases (Hajieva et al., 2015). Besides well-known lipids like phospholipids and cholesterol, the membrane also contains so-called glycosphingolipids. In addition to their hydrophobic membrane anchor, glycosphingolipids contain a hydrophilic head group consisting of variable carbohydrate residues.

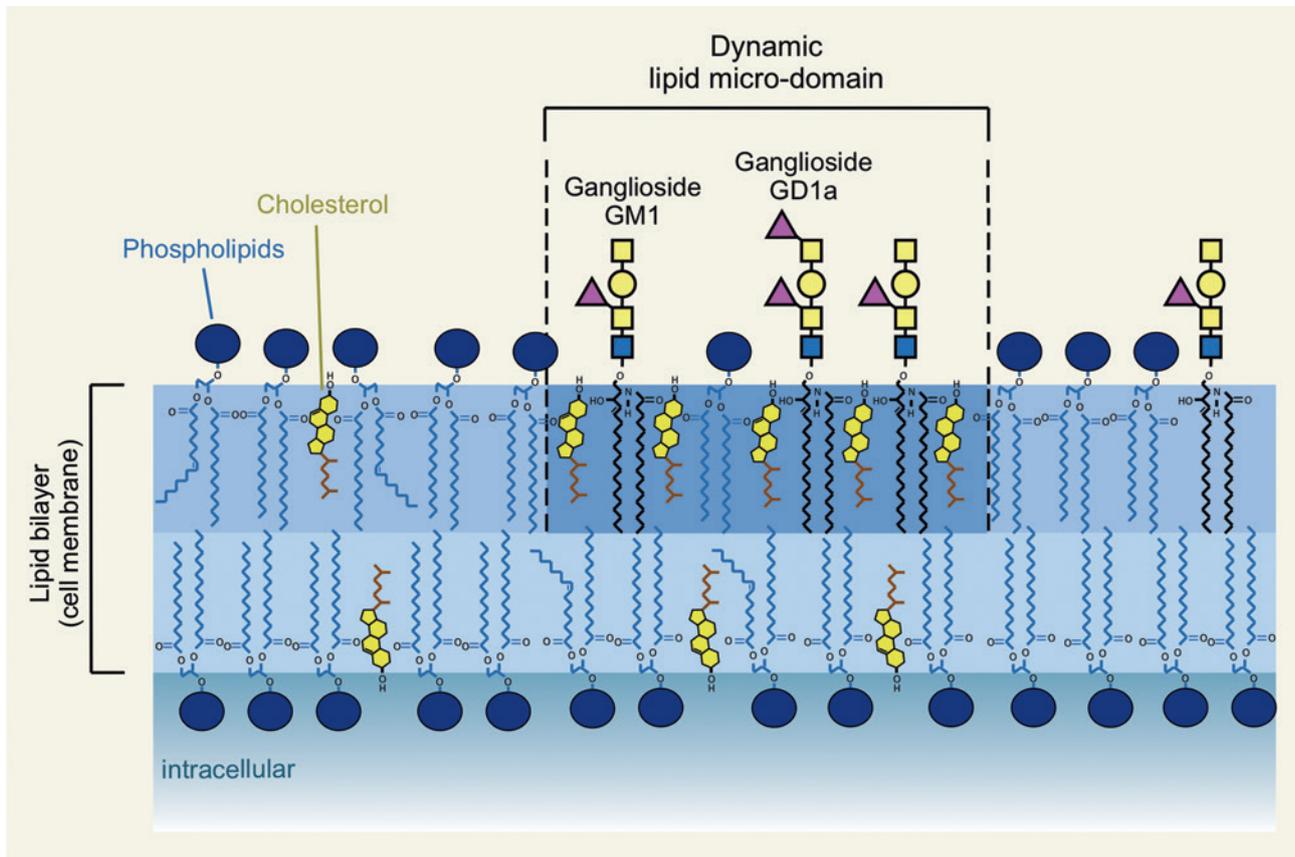


Fig. 2: Scheme of the neuronal membrane. The cell membrane is composed of a lipid bilayer. Phospholipids and cholesterol are the main components. Specific glycosylated lipids, the so-called gangliosides, are located in the outer leaflet of the cell membrane. They take part in the formation of so-called lipid micro-domains, which are characterized by a high content of gangliosides and cholesterol. Important cellular processes, such as transmembrane receptor signal transduction, are mainly taking place in lipid micro-domains.

Gangliosides, a sub-class of glycosphingolipids, are highly expressed in the central nervous system and located in the outer leaflet of the plasma cell membrane (Fig. 2 and Excursion 1). Gangliosides play an important role in postnatal brain development (Jennemann et al., 2005) and modulate the activity of transmembrane receptors in adult neurons (Nordström et al., 2013).

The cell membrane contains so-called lipid micro-domains (Fig. 2), which are characterized by high amounts of sphingolipids and cholesterol, but also by specific proteins, such as caveolin-1 and transmembrane receptors. Within these dynamic nano structures, important membrane processes, such as signal transduction, endo-, and exocytosis take place (Inokuchi, 2010). Gangliosides contribute to the formation of these membrane micro-domains (Fig. 2). We could show that gangliosides modulate the activity and sensitivity of transmembrane receptors by dynamic molecular interactions. In the following sections, we describe how alterations in neuronal ganglioside biosynthesis influences both neuronal insulin sensitivity

and disease progression in a mouse model of Alzheimer's disease.

Inhibition of ganglioside biosynthesis increases the insulin sensitivity of hippocampal neurons

Already a decade ago, it was observed that ganglioside GM3 acts as a natural inhibitor of IR in white adipocytes (Kabayama et al., 2007). In line with these findings, an inhibition of ganglioside biosynthesis successfully counteracted liver steatosis and high blood glucose levels in obese mice (Zhao et al., 2009). Contrary to liver and fat cells, neurons mainly synthesize complex gangliosides. Since individual ganglioside species are not redundant and able to regulate receptors differentially, we initially needed to investigate if ganglioside depletion was able

to increase the insulin sensitivity of neurons and thereby protect them from the detrimental effects of ADDLs.

For our experiments on cultivated hippocampal neurons, we inhibited the key enzyme in ganglioside biosynthesis, the glucosylceramide synthase (GCS), with the help of a pharmacologic inhibitor GENZ-123346 (GENZ) (Richards et al., 2012) (Fig. 3a). We indeed observed an increased insulin-dependent signal transduction in GENZ-treated neurons (Herzer et al., 2016). Since the ERK1/2 signaling pathway stimulates neuronal survival and cognitive function, the specific elevation in ERK1/2-dependent signaling in GENZ-treated cells is noteworthy in regard to Alzheimer's disease. Interestingly, the GENZ treatment does not only elevate IR signal transduction, but also the amount of IR in treated neurons (Herzer et al., 2016). Consequently, we have investigated if the inhibition of ganglioside biosynthesis and the concomitant increased insulin sensitivity can indeed protect neurons in models of Alzheimer's disease.

Inhibition of ganglioside biosynthesis protects neurons against the detrimental effects of ADDLs

Neuronal insulin resistance is one of the highly complex pathological features of Alzheimer's disease, leading to impaired synaptic function and neurodegeneration. Neurotoxic ADDLs, which are generated during Alzheimer's disease, induce the loss of dendritic IR and thereby contribute to insulin resistance (De Felice et al., 2009). Thus, an important aim was to find out if the inhibition of ganglioside biosynthesis by GENZ could protect hippocampal neurons from ADDL stress. We indeed observe the following neuroprotective effects when treating these neurons with GENZ (Herzer et al., 2016):

Viability. The MTT viability assay measures the metabolic activity of the cells. The required enzyme activity correlates with cell viability. ADDLs significantly reduce the viability of hippocampal neurons. However, a preceding GENZ treatment increases the viability of neurons, which are exposed to ADDLs (Fig. 3b).

Cell surface IR. ADDLs induce a loss of IR at the neuronal cell surface. However, this can be counteracted by GENZ treatment.

Insulin-dependent signal transduction. The loss of surface IR ultimately impairs insulin-dependent signal transduction. The innovative proximity ligation assay (PLA®, Duolink®) detects phosphorylated and thereby active IR

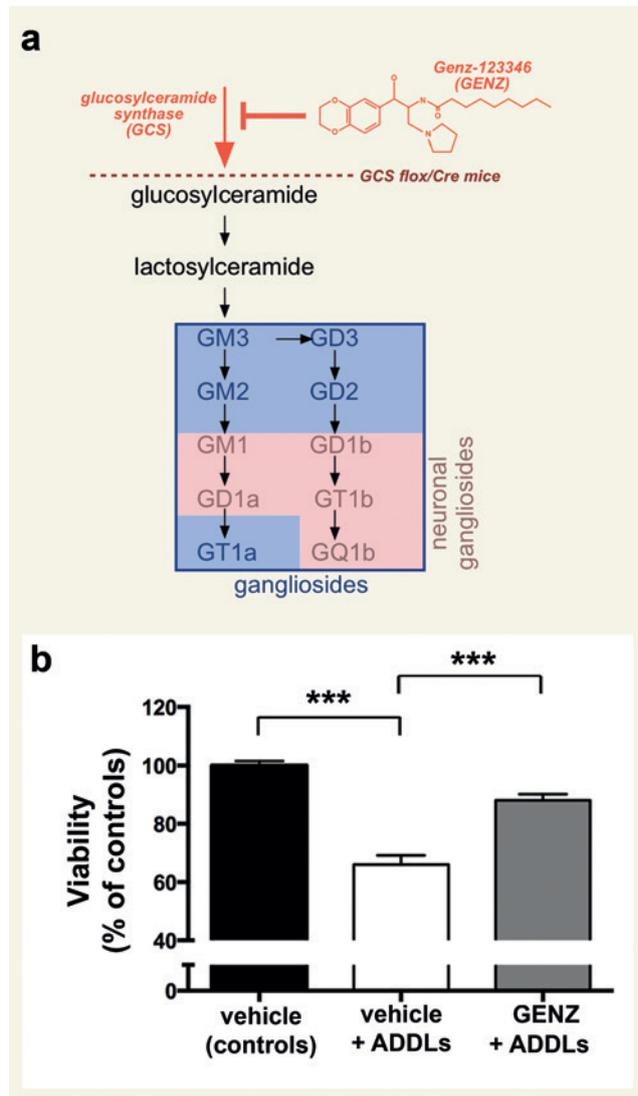


Fig. 3: Inhibiting ganglioside biosynthesis protects neurons against neurotoxic oligomeric β -amyloid species (ADDLs). **a** Glucosylceramide synthase (GCS) is the key enzyme in ganglioside biosynthesis. Ganglioside biosynthesis can be inhibited either pharmacologically by the ceramide analogue GENZ-123346 (GENZ) or genetically by cell-specific deletion of the *Ugcg* allele (*Ugcg* flox/flox//Cre mice). The promoter regulating the expression of the Cre recombinase determines the target cells where ganglioside biosynthesis will be shut down. **b** ADDL exposure reduces neuronal viability. However, GENZ-treated neurons are more resistant towards the detrimental effects of ADDLs (Fig. 3.b) modified from Herzer et al., 2016).

along the dendrites of cultivated neurons (Fig. 4.a.). In line with results from other groups (De Felice et al., 2009), the PLA® shows that ADDLs impair the insulin-stimulated phosphorylation of dendritic IR. However, this detrimental effect can be counteracted by GENZ treatment (Fig. 4.b.).

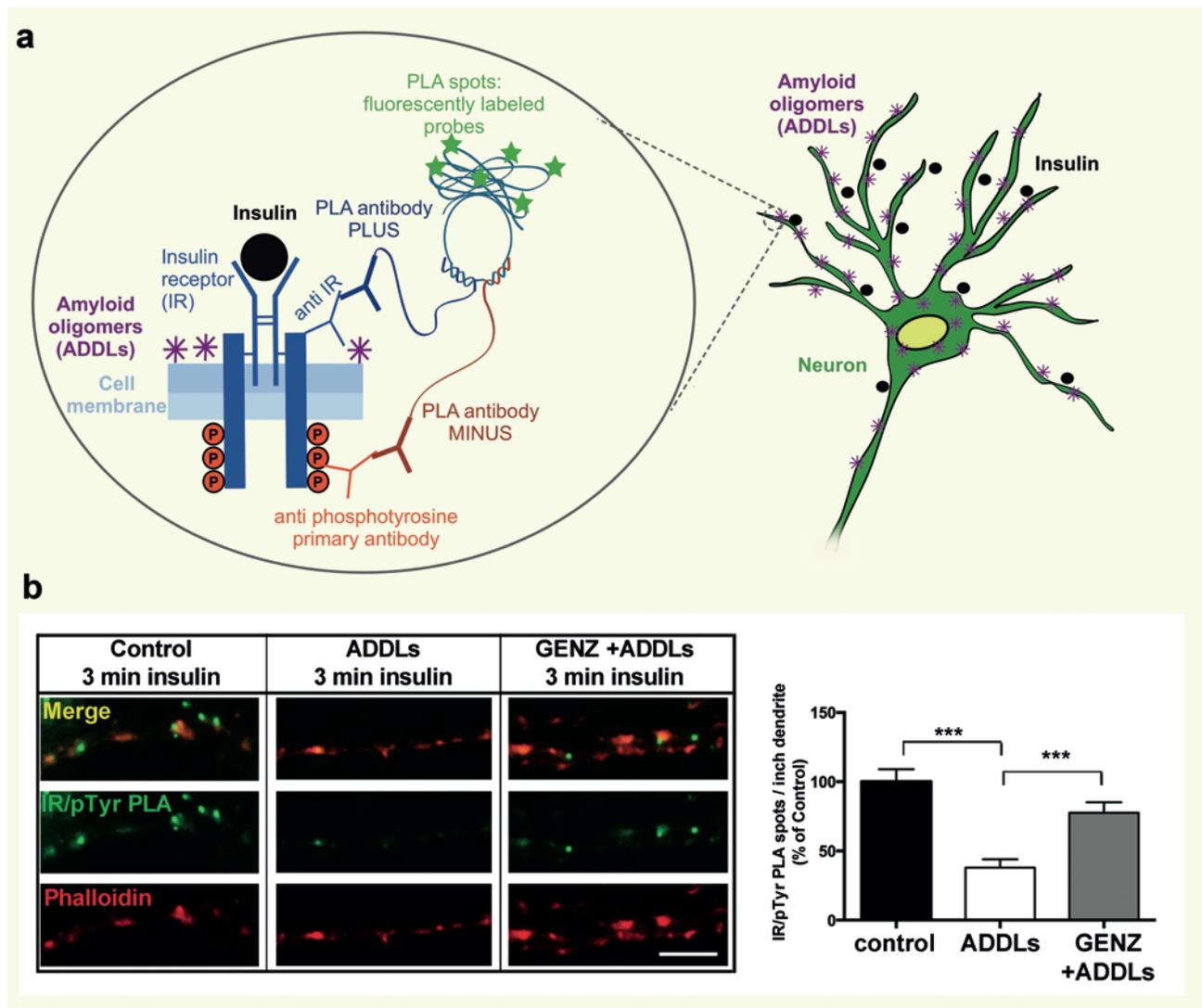


Fig. 4: Insulin sensitivity is increased in GENZ-treated cells in a model of Alzheimer's disease. **a** Molecular interactions can be visualized by the innovative technology proximity ligation assay (PLA®). The PLA® enables the detection of interaction partners by primary antibodies (two different host species) and oligonucleotide-coupled PLA® secondary antibodies. The adapter oligonucleotides will be ligated and form a template for the subsequent "rolling circle amplification" step. The amplicon will then be visualized by a fluorescently labeled probe. Phosphorylated and thus active IR can be visualized by PLA® along the dendrites. **b** Cultivated neurons are exposed to neurotoxic β -amyloid oligomers (ADDLs) in a model of Alzheimer's disease. The PLA® shows a decline in insulin-stimulated IR phosphorylation after ADDL exposure. However, the inhibition of ganglioside biosynthesis by GENZ maintains the insulin sensitivity of ADDL-exposed neurons (Fig. 4.b) modified from Herzer et al., 2016).

Reduction of caveolin-1 by GENZ stabilizes IR levels on the neuronal cell surface

Caveolae, formed by the protein caveolin-1, are specialized membrane micro-domains in which endocytosis takes place. Moreover, high amounts of cholesterol and sphingolipids are found in caveolae. Interestingly, gangli-

oside-deficient neurons display less caveolin-1 and, consequently, a lower number of caveolae (Herzer et al., 2016).

Upon ligand binding, IR are internalized both in clathrin-coated pits and caveolae. Thus, caveolin-1 can regulate the amount of cell surface IR. Since caveolin-1 levels are increased in the brains of Alzheimer's disease patients (Gaudreault et al., 2004), caveolae are regarded as potentially decisive factors for the development of this disease. With the help of the PLA®, we are able to show for the

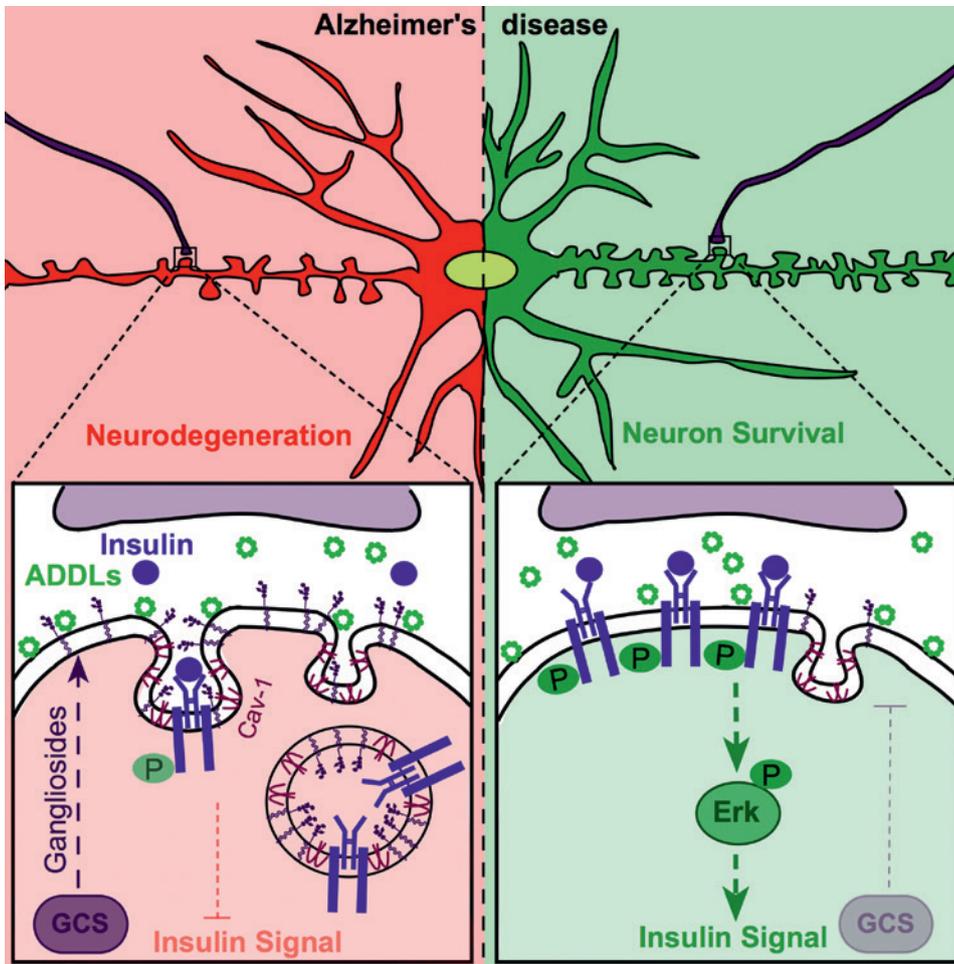


Fig. 5: Inhibition of the ganglioside biosynthesis protects against Alzheimer's disease-induced neurodegeneration and insulin resistance. The results suggest that gangliosides facilitate the β -amyloid-induced IR endocytosis in caveolae and thereby contribute to neurodegeneration (left scheme). However, inhibiting GCS decreases the levels of caveolin-1 and increases the viability and the insulin sensitivity of neurons in a model of Alzheimer's disease (right scheme). We suggest that GCS inhibition also accounts for the increased viability of ganglioside-deficient neurons in our mouse model of Alzheimer's disease (Fig. 5 modified from Herzer et al., 2016).

first time that ADDLs significantly induce direct molecular interactions between *a) caveolin-1 and ganglioside GD1a*, *b) IR and GD1a*, and *c) IR and caveolin-1*. We suggest that increased interactions between IR and caveolin-1, mediated by gangliosides, are required for IR endocytosis (Herzer et al., 2016).

Thus, we postulate a novel molecular mechanism by showing that gangliosides in the neuronal cell membrane facilitate Alzheimer's disease-induced insulin resistance by stimulating caveolin-1 expression and its molecular interactions with IR. An inhibition of GCS and a subsequent reduction of caveolae stabilize the IR in neurons exposed to neurotoxic ADDLs (Fig. 5).

Inhibition of ganglioside biosynthesis also protects Alzheimer's disease mice against neurodegeneration

GCS and subsequent ganglioside biosynthesis can be genetically deleted in adult neurons of a mouse model of Alzheimer's disease (5xFAD mice; Excursion 2). In fact, these animals display a significantly lower neurodegeneration in the cerebral cortex, even though the amyloid plaque burden is not reduced. Moreover, GCS deletion protects Alzheimer's disease mice from the loss of IR in the cerebral cortex.

Our hypothesis suggests that gangliosides facilitate the β -amyloid-induced IR internalization taking place in caveolae. Indeed, molecular interactions between caveolin-1 and IR, which occur in Alzheimer's disease, can be prevented by GCS deletion (Herzer et al., 2016). Thus, key findings from our cell culture work can be confirmed in a mouse model of Alzheimer's disease.

Outlook

It has been suggested for a long time, that membrane lipids not only represent a mechanical barrier, but that they actively modulate signal transduction processes as well as other changes occurring in neurodegenerative diseases. Specifically with regard to Alzheimer's disease, it was shown that membrane fluidity, determined by the lipid composition of cell membranes, influences APP processing (Hajieva et al., 2015). Our results now motivate a novel hypothesis, suggesting that gangliosides in the cell membrane may facilitate the ADDL-induced neuronal insulin resistance and, as a consequence, also neurodegeneration. This indicates that neuronal ganglioside biosynthesis may potentially play a decisive role in the progression of Alzheimer's disease. Inhibiting the key enzyme in ganglioside biosynthesis, the GCS, might therefore potentially constitute a novel therapeutic target against Alzheimer's disease.

However, the hypothesis that modulating GCS expression could possibly influence the course of Alzheimer's disease requires additional empirical support by extensive and purposeful future studies. For example, a hypothesized therapeutic potential of GCS inhibitors, such as GENZ, needs to be evaluated in more detail, specifically in animal models of sporadic Alzheimer's disease. In this regard, it will be most important to evaluate if neuronal GCS inhibition exerts any effect on the cognitive function of affected mice.

Moreover, additional cell types in the brain, particularly glial cells, play an important role in the initiation and progression of Alzheimer's disease. Neuroinflammatory changes elicited by astrocytes and microglia are suspected to facilitate, if not to elicit, sporadic Alzheimer's disease. Thus, it will be a decisive goal to find out how gangliosides in these cells contribute to the onset of neuroinflammation. This can be achieved by combinatorial *in vivo* and *in vitro* experiments featuring GCS inhibition in astrocytes or microglia. Evaluating glial morphology as well as the cognitive function and neuronal connections in affected mice with glial-specific GCS deletion will be a first step in order

to find out whether gangliosides are able to modulate neuroinflammation and, subsequently, pathological changes in Alzheimer's disease.

Excursion 1: Gangliosides

Gangliosides are lipids with a specific chemical structure that are found in the outer leaflet of the cell membrane. They were initially isolated from brain tissue in 1942 by Ernst Klenk, who also gave them the name "gangliosides". Besides very high amounts in the brain, gangliosides are found in virtually all cells of the body. They contribute to the formation of dynamic micro-domains in cellular membranes, where they modulate the activity of transmembrane receptors. Gangliosides display a hydrophobic ceramide membrane anchor and a hydrophilic head group consisting of a variable carbohydrate chain. Typically, gangliosides have one or more sialic acid residues in their head groups. Glucosylceramide synthase (GCS) is the key enzyme in ganglioside biosynthesis, which catalyzes the addition of an activated glucosyl moiety to ceramide. The subsequent addition of a galactosyl moiety leads to the formation of the common ganglioside precursor lactosylceramide. Additional carbohydrate moieties are then added by the sequential activity of further enzymes. Through this process, various ganglioside species are formed that differ in the composition of their head groups. Different cell types display different ganglioside expression patterns. Whereas neurons express high amounts of the complex gangliosides GM1, GD1a, GT1b, and GQ1b, astrocytes mainly express gangliosides with simple structures, such as GM3 and GD3.

Excursion 2: Ganglioside-deficient mouse model of Alzheimer's disease

Ganglioside biosynthesis can be inhibited cell-specifically by genetic deletion of the key enzyme of ganglioside biosynthesis (GCS, gene *Ugcg*) (Jennemann et al., 2005). This is accomplished with the help of the so-called Cre-loxP system, which specifically deletes marked ("floxed") DNA sequences. The promoter that regulates Cre expression determines the target cells where the recombinase shall be active. Mice with floxed *Ugcg* alleles are therefore crossed with animals expressing the cutting enzyme Cre recombinase specifically in forebrain neurons (Nordström et

al., 2013). As Cre activity is inducible by tamoxifen in these mice, ganglioside biosynthesis can be specifically deleted in adult forebrain neurons. Mice harboring a GCS deletion in adult forebrain neurons are then cross-bred with a common mouse model of Alzheimer's disease, the so-called 5xFAD mice (Oakley et al., 2006). 5xFAD mice display an early-onset progressive variant of Alzheimer's disease, as well as β -amyloid deposition and neurodegeneration starting at the age of three months.

Acknowledgement: Our work is supported by the Alzheimer Forschung Initiative e.V. and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-Grants NO-1107/1-1 and HE-7978/1-1).

Literature

- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeits Psychi- Atry Psych. Med* 64, 146–148.
- Bennett, D. A. (2006). Postmortem indices linking risk factors to cognition: results from the Religious Order Study and the Memory and Aging Project. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 20, S63-8.
- Biessels, G. J., Kamal, A., Ramakers, G. M., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., and Gispen, W. H. (1996). Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 45, 1259–1266.
- Chiu, S.-L., and Cline, H. T. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* 5, 7.
- Clement, A. B., Gimpl, G., and Behl, C. (2010). Oxidative stress resistance in hippocampal cells is associated with altered membrane fluidity and enhanced nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1236–1241.
- De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K. L., Zhao, W.-Q., Ferreira, S. T., and Klein, W. L. (2009). Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1971–1976.
- Gaudreault, S. B., Dea, D., and Poirier, J. (2004). Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging* 25, 753–759.
- Hajieva, P., Bayatti, N., Granold, M., Behl, C., and Moosmann, B. (2015). Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. *J. Neurochem.* 133, 352–367.
- Head, E., Pop, V., Vasilevko, V., Hill, M., Saing, T., Sarsoza, F., Nistor, M., Christie, L.-A., Milton, S., Glabe, C., et al. (2008). A two-year study with fibrillar beta-amyloid (Abeta) immunization in aged canines: effects on cognitive function and brain Abeta. *J. Neurosci.* 28, 3555–3566.
- Heidenreich, K. A., Zahniser, N. R., Berhanu, P., Brandenburg, D., and Olefsky, J. M. (1983). Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. *J. Biol. Chem.* 258, 8527–8530.
- Herzer, S., Meldner, S., Gröne, H.-J., and Nordström, V. (2015). Fasting-induced lipolysis and hypothalamic insulin signaling are regulated by neuronal glucosylceramide synthase. *Diabetes* 64, 3363–3376.
- Herzer, S., Meldner, S., Rehder, K., Gröne, H.-J., and Nordström, V. (2016). Lipid microdomain modification sustains neuronal viability in models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 4.
- Inokuchi, J. (2010). Membrane microdomains and insulin resistance. *FEBS Lett.* 584, 1864–1871.
- Jennemann, R., Sandhoff, R., Wang, S., Kiss, E., Gretz, N., Zuliani, C., Martin-Villalba, A., Jäger, R., Schorle, H., Kenzelmann, M., et al. (2005). Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12459–12464.
- Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., and Inokuchi, J. (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13678–13683.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., and Peck, A. (1988). Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* 23, 138–144.
- Krstic, D., and Knuesel, I. (2013). Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 25–34.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448–6453.
- Lannert, H., and Hoyer, S. (1998). Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.* 112, 1199–1208.
- Marks, J. L., and Eastman, C. J. (1990). Ontogeny of insulin binding in different regions of the rat brain. *Dev. Neurosci.* 12, 349–358.
- Nordström, V., Willershäuser, M., Herzer, S., Rozman, J., von Bohlen Und Halbach, O., Meldner, S., Rothermel, U., Kaden, S., Roth, F. C., Waldeck, C., et al. (2013). Neuronal expression of glucosylceramide synthase in central nervous system regulates body weight and energy homeostasis. *PLoS Biol.* 11, e1001506.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* 26, 10129–10140.
- Reger, M. A., Watson, G. S., Frey, W. H., Baker, L. D., Cholerton, B., Keeling, M. L., Belongia, D. A., Fishel, M. A., Plymate, S. R., Schellenberg, G. D., et al. (2006). Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol. Aging* 27, 451–458.
- Richards, S., Larson, C. J., Koltun, E. S., Hanel, A., Chan, V., Nachtigall, J., Harrison, A., Aay, N., Du, H., Arcalas, A., et

- al. (2012). Discovery and Characterization of an Inhibitor of Glucosylceramide Synthase.
- Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C., and Porte, D. (1992). Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocr. Rev.* 13, 387–414.
- Simons, M., de Strooper, B., Multhaup, G., Tienari, P. J., Dotti, C. G., and Beyreuther, K. (1996). Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 16, 899–908.
- Slunt, H. H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A. C., Tanzi, R. E., and Sisodia, S. S. (1994). Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J. Biol. Chem.* 269, 2637–2644.
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., and de la Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers. Dis.* 7, 63–80.
- Thaler, J. P., Yi, C.-X., Schur, E. A., Guyenet, S. J., Hwang, B. H., Dietrich, M. O., Zhao, X., Sarruf, D. A., Izgur, V., Maravilla, K. R., et al. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 153–162.
- Walker, J. M., and Harrison, F. E. (2015). Shared neuropathological characteristics of obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease: Impacts on cognitive decline. *Nutrients* 7, 7332–7357.
- Wozniak, M., Rydzewski, B., Baker, S. P., and Raizada, M. K. (1993). The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 22, 1–10.
- Zhao, W. Q., and Alkon, D. L. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol. Cell. Endocrinol.* 177, 125–134.
- Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I.-H., Zhang, J., Maniatis, P., Pacheco, J., Piepenhagen, P., Copeland, D., Arbeen, C., Shayman, J. A., et al. (2009). Inhibiting glycosphingolipid synthesis ameliorates hepatic steatosis in obese mice. *Hepatology* 50, 85–93.

Article note: German version available at <https://doi.org/10.1515/nf-2017-0007>

Bionotes



Dr. rer. nat. Viola Nordström

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie/G130, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften (IZN), Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Germany
Mail: v.nordstroem@dkfz.de
Web: <http://www.uni-heidelberg.de/izn/researchgroups/nordstroem/>

Dr. Viola Nordström (born in 1981) studied biology at the University of Göttingen and the University of Lund in Lund/Sweden. She obtained her PhD in 2010 at the DKFZ in Heidelberg. Since 2010, she is working as a scientist and since 2012, as a project group leader in the Department of Cellular and Molecular Pathology (Prof. Dr. H.-J. Gröne) at the DKFZ in Heidelberg. Since 2013, her group is also associated with the Interdisciplinary Center for Neurosciences (IZN) at the University of Heidelberg. In 2015, she received the Erwin-Niehaus Award of the Erwin-Niehaus-Stiftung and the Alzheimer Forschung Initiative e. V. for her research project on Alzheimer's disease.



Dr. rer. nat. Silke Herzer

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie/G130, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften (IZN), Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Germany

Dr. Silke Herzer (born in 1982) studied biology at the University of Heidelberg and the Karolinska Institute in Stockholm/Sweden (Prof. Björn Meister). She obtained her PhD in 2016 at the DKFZ in Heidelberg. Since 2016, she is working as a scientist in the research group of Dr. Viola Nordström, which is located in the Department of Cellular and Molecular Pathology (Prof. Dr. H.-J. Gröne) at the DKFZ in Heidelberg.

Übersichtsartikel

Jens Rettig* und David R. Stevens

Synaptische Transmission im Immunsystem

<https://doi.org/10.1515/nf-2016-0052>

Zusammenfassung: Die Freisetzung von Neurotransmittern an Synapsen gehört zu den wichtigsten Mechanismen im zentralen Nervensystem. In den zurückliegenden Jahrzehnten konnten viele Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, die diesem Prozess zugrunde liegen, gesammelt werden. Die hochregulierte Exozytose, die auf dem SNARE-Komplex („soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“) und seinen regulatorischen Molekülen basiert, ist das Merkmal des Nervensystems sowohl in Neuronen als auch in neuroendokrinen Zellen. Zellen des Immunsystems benutzen einen ähnlichen Mechanismus, um zytotoxische Substanzen aus sekretorischen Granulen freizusetzen. Diese Sekretion findet an Kontaktzonen mit Zelle statt, die mit Viren oder Bakterien infiziert sind sowie Krebszellen, um diese Bedrohung zu beseitigen. Diese Kontaktzonen werden als immunologische Synapsen bezeichnet im Hinblick auf die hochspezifische, zielgerichtete Exozytose von Effektormolekülen. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Mutationen in den SNARE oder SNARE-interagierenden Proteinen die Grundlage für zahlreiche schwerwiegende immunologische Erkrankungen sind. Obwohl SNARE-Komplexe ubiquitär vorkommen und eine große Vielfalt an Fusionsereignissen an der Membran vermitteln, ist es überraschend, dass in vielen Fällen die gleichen SNARE – Proteine an der immunologischen Synapse beteiligt sind, die die Regulation der Exozytose von Transmittern und Hormonen in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vermitteln. Diese Ähnlichkeiten zeigen die Möglichkeit auf, dass Erkenntnisse, die von immunologischen Synapsen erhalten wurden, auch auf neuronale Synapsen zutreffen, insbesondere im Bereich der präsynaptischen Funktion. Da immunologische Synapsen (IS) innerhalb von etwa 30 Minuten gebildet und wieder abgebaut werden, ermöglicht

die Verwendung von Immunzellen, die aus humanem Blut gewonnen wurden, nicht nur die Untersuchung der molekularen Mechanismen der synaptischen Transmission in menschlichen Zelle, sondern auch Untersuchungen der Bildung und des Abbaus dieser „Synapsen“ mittels bildgebender Verfahren. In diesem Übersichtsartikel vergleichen wir die Ähnlichkeit der Synapsen des Nerven- und Immunsystems und gehen dabei auf unsere Erkenntnisse der Arbeiten der letzten Jahre ein.

Schlüsselwörter: Chromaffinzellen; Immunologische Synapse; SNARE-Proteine; Zytotoxische T-Lymphozyten

Einleitung

Eine Synapse (gr. *syn* ‚zusammen‘ und *haptein* ‚greifen‘) bezeichnet die Kontaktstelle zwischen zwei Zellen, an der über die Freisetzung von Botenstoffen Information übertragen wird. Sie wird üblicherweise unterteilt in Präsynapse, synaptischer Spalt und Postsynapse. Eine riesige Anzahl an Synapsen (ca. 10¹³) im Menschen kommen vor zwischen Neuronen des zentralen Nervensystems und bilden die Grundlage für plastische Prozesse wie Lernen, Gedächtnisbildung und Demenz. Beta-Zellen im Pankreas und Chromaffinzellen in der Nebenniere nutzen ähnliche Mechanismen, um Botenstoffe wie Insulin und Adrenalin freizusetzen, welche dann über den Blutstrom auf viele Zielzellen systemisch wirken. Sowohl natürliche Killerzellen des angeborenen Immunsystems als auch T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems bilden auf der Suche nach Pathogenen hochspezifische Kontaktstellen mit Antigen-präsentierenden Zellen aus. An diesen Kontaktstellen findet die gezielte Freisetzung von zytotoxischen Substanzen statt, die diese Zielzellen abtöten. Sie werden immunologische Synapsen genannt. Genetische Studien in immun-defizienten Patienten zeigten dabei, dass diese immunologische Synapse (IS) in ihrer Funktion verblüffende Parallelen mit Synapsen im ZNS und neuroendokrinen System aufweist. Obwohl sie als Synapsen bezeichnet werden, gibt es wichtige Unterschiede zwischen immunologischen und neuronalen Synapsen. Es gibt wenig Ähnlichkeit zwischen der Zielzellerkennung durch T-Lymphozyten, wie weiter unten diskutiert wird, und dem

*Korrespondenzautor: Jens Rettig, Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg, E-Mail: jrettig@uks.eu

David R. Stevens, Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg, E-Mail: david.stevens@uks.eu

Erkennungsprozess der neuronalen Synapse, ein faszinierender Bereich (Akins und Biederer, 2006), der jedoch nicht in diesem Artikel behandelt wird. Wir werden uns auf den präsynaptischen Mechanismus konzentrieren, da immunologische Synapse keine postsynaptischen Organisation von Rezeptoren benötigen, eine Notwendigkeit bei echten Synapsen. Die Chromaffinzelle der Nebenniere, die als ein Modell für regulatorische Exozytose genutzt wird, bildet auch keinen Kontakt zur Zielzelle aus. Beide, Neurone und Chromaffinzellen generieren große Reserven an Vesikeln und einen präsynaptischen Apparat, der den Transfer der Vesikel vom releasable pool über docking und priming organisiert. T-Lymphozyten fehlt ein reserve pool und sie besitzen keinen releasable pool. Dieses wird im Text diskutiert. T-Lymphozyten exprimieren Komponenten des Fusionsapparates und docking und priming findet doch statt.

Allein im letzten Jahrzehnt wurden Proteine wie Syntaxin11, Munc13-4, Munc18-2 und Rab27a identifiziert, deren Mutation aufgrund des vollständigen Ausfalls der Funktion der immunologischen Synapse zu letalen Immunphänotypen führt (Janka, 2012). Diese Ergebnisse zeigen grundsätzliche Ähnlichkeiten zwischen Exozytose von Lymphozyten und neuronalen und neuroendokrinen Zellen. Im Gegensatz zu Synapsen im ZNS und neuroendokrinen Geweben bilden sich immunologische Synapsen innerhalb von 30 Minuten und werden schnell abgebaut, sodass neue Zielzellen gefunden werden können. So ist neben der Untersuchung der Synapsenfunktion auch die Untersuchung der Synapsenbildung und des Synapsenabbaus mit hochauflösenden Methoden möglich. Zusammen mit der Verfügbarkeit menschlichen Materials aus Primärblood eröffnet das Studium der immunologischen Synapse damit Erkenntnisse, die im Rückschluss auf die neuronalen Synapsen übertragbar sind. Im Falle der präsynaptischen Funktion und dem Recycling des exozytotischen Apparates scheint dies zuzutreffen.

In diesem Übersichtsartikel fassen wir die Prozesse der Bildung, der Funktion und des Abbaus der immunologischen Synapse zusammen und vergleichen diese Prozesse, wo möglich, mit Erkenntnissen aus Chromaffinzellen der Nebenniere.

Synapsenbildung

Neuronale Synapsen werden als Antwort auf interzelluläre Interaktionen von Adhäsionsmolekülen gebildet (Akins und Biederer, 2006). Beide, Neuroligin-Proteine und SynCAM1, sind Marker für postsynaptische Kontaktstellen.

Sobald Neurone mit einem dieser Marker, auch in non-neuronalen Zellen, in Kontakt kommen, wird eine präsynaptische Spezialisierung in den Neuronen induziert. Adhäsionsmoleküle akkumulieren an diesen Kontaktstellen und ziehen andere assoziierte Moleküle an, die an der Bildung der Aktiven Zone beteiligt sind. Die Moleküle der aktiven Zone und des Exozytoseapparates interagieren mit Bindungsstellen der zytosolischen Bereiche der Adhäsionsmoleküle und untereinander. In Neuronen und Chromaffinzellen wirken große Multi-Domänen-Proteine wie Bassoon und Piccolo als Gerüst und organisieren die Strukturen, die für den Transfer der Vesikel vom Reserve Pool zum Docking- und Priming Apparat nötig sind (Gundelfinger et al., 2015). Diese Organisationsmoleküle werden mit anderen Komponenten der aktiven Zone, wie Piccolo, Bassoon, Syntaxin, RIM, Munc-18, ELKS2/CAST, SNAP-25 und n-Cadherin in Transportvesikeln zu den präsynaptischen Kompartimenten geliefert. Diese Transportvesikel wandern entlang von Mikrotubuli (Bury und Sabo, 2016). Die Moleküle der aktiven Zone und ihre Transportvesikel werden im Soma generiert, genauso wie synaptische Vesikel und LDCVs. In Neuronen erfolgt dieser Transport über lange Distanzen. In Chromaffinzellen sind die Distanzen viel kürzer, aber die Organisation ist ähnlich. Die aktive-Zone – Proteine sind nicht nur am Docking und Priming beteiligt, sie ziehen auch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle an, die für die stimulierte Exozytose notwendig sind. Bis jetzt ist es nicht gelungen, jedem einzelnen Molekül eine bestimmte Funktion zuzuordnen. Studien, in denen einzelne Moleküle herunterreguliert (knockdown) oder entfernt wurden (knockout), haben überraschend geringfügige Unterschiede im Phänotyp gezeigt (Südhof, 2012). Es mag sein, dass die vielen Interaktionen dieser Multi-Domän-Proteine eine funktionelle Redundanz hervorrufen, besonders in bereits entwickelten Geweben.

Chromaffinzellen der Nebenniere kontrollieren über die Sekretion von den Katecholaminen (Adrenalin und Noradrenalin) wichtige physiologische Parameter, wie zum Beispiel den Blutdruck und den Herzschlag. Die Katecholamine werden in large dense core vesicles (LDCVs) gespeichert, die eine Vielzahl von Maturierungsschritten durchlaufen (Fig. 1) Die Biogenese dieser Granulen steht jedoch nicht im Blickfeld dieser Übersicht. Die v-SNARE Proteine Synaptobrevin und die Synaptotagmine werden mit Rab3, Synaptophysin, vATPase, und Neurotransmitter Transporter (VMAT bei Chromaffinzellen) erworben während des Trafficking durch das trans-Golgi und endosomale Kompartimente, wo viele dieser Verbindungen wiederverwertet werden. Nach dem Transport zur Plasmamembran werden die LDCVs in einem Docking-Prozess an

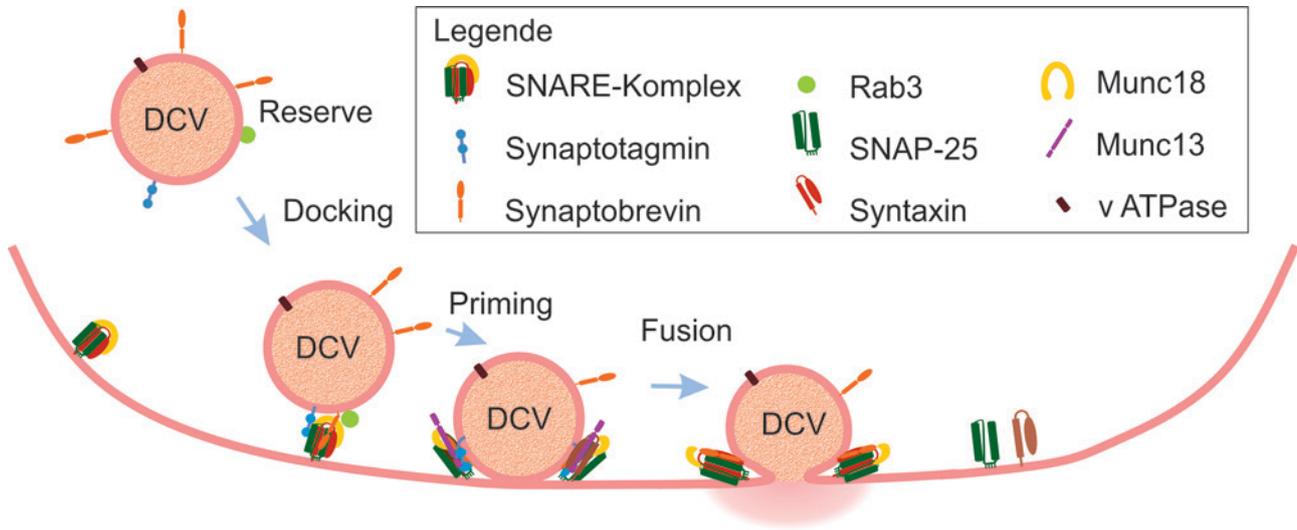


Abb. 1: Synapsenfunktion in Chromaffinzellen der Nebenniere. Cartoon mit den wichtigsten Schritten der LDCV-Reifung und den beteiligten Proteinen. LDCVs aus dem Reserve Pool im Zellinneren werden über das Zytoskelett zur Plasmamembran transportiert und dort verankert. Nach diesem Docking-Prozess werden LDCVs an der Plasmamembran durch den Priming-Prozess fusionskompetent gemacht. Anschließend erfolgt nach Ca^{2+} -Einstrom die Fusion mit der Plasmamembran und die Freisetzung der Katecholamine.

der Plasmamembran verankert. Chromaffinzellen dienen als Modell zur Erforschung präsynaptischer Prozesse.

und Fusion von LDCVs in Chromaffinzellen beteiligt (Stevens et al., 2011).

Docking, Priming und Fusion von LDCVs in Chromaffinzellen

Der Docking-Komplex wird über eine Interaktion der beiden plasmamembranständigen SNARE-Proteine Syntaxin1 und SNAP-25 mit dem vesikelständigen Protein Synaptotagmin initiiert (de Wit et al., 2009). Die Verfügbarkeit von Syntaxin1 und damit die Effizienz des Docking-Prozesses wird dabei durch Munc18 reguliert. Das gedockte LDCV ist damit aber noch nicht fusionskompetent, sondern muss erst einen weiteren Maturierungsprozess, das sogenannte Priming, durchlaufen. Munc13-Proteine sind für das Priming der meisten Synapsen unbedingt notwendig. Sie katalysieren den Zusammenbau des SNARE-Komplexes aus Syntaxin1, SNAP-25 und dem vesikelständigen SNARE-Protein Synaptobrevin2. Vor Kurzem wurde gezeigt, dass Munc13 Proteine auch beim Priming-Prozess in Chromaffinzellen beteiligt sind (Man et al., 2015). Der SNARE-Komplex kann dann, nach Einstrom von Ca^{2+} in die Präsynapse und Bindung des Ca^{2+} an Synaptotagmin, die Fusion des LDCVs mit der Plasmamembran und die Ausschüttung der Katecholamine vermitteln. Eine Vielzahl weiterer Proteine, wie z. B. Complexin und CAPS, ist darüber hinaus an der Regulation von Docking, Priming

Synapsenbildung in CTLs

Zytotoxische T-Lymphozyten patrouillieren auf der Suche nach Infektionen durch das komplette menschliche Gewebe. Sie werden im Blutstrom transportiert, durchdringen Gefäßwände und migrieren durch sämtliche Organe des Körpers. Haben Sie infiziertes Gewebe detektiert, können sie nach Aktivierung eine große Anzahl an Zielzellen hintereinander abtöten, man spricht von „serial killing“. Von offensichtlich großer Wichtigkeit ist dabei die Präzision der Zielerkennung, denn CTLs sollen nur diejenigen Zellen abtöten, die körperfremdes Material präsentieren. Demzufolge existiert ein großer Gegensatz zwischen Chromaffinzellen, die einen großen Pool an freisetzbaren LDCVs vorhalten, und CTLs, die nur wenige CGs bereithalten und diese bei Bedarf zur IS transportieren.

Die Bildung der IS beginnt mit der Erkennung von präsentierten Antigenen auf der Oberfläche der Zielzellen durch T-Zell-Rezeptoren der CTLs (Abb. 2). Die Präsentation erfolgt durch MHC (major histocompatibility complex)-Komplexe, die durch das Proteasom degradierte Peptide im endoplasmatischen Retikulum binden und diese nach Transport zur Plasmamembran auf der Zelloberfläche präsentieren. Die Mehrzahl der präsentierten Peptide ist nicht körperfremd und führen dementsprechend zu keiner Im-

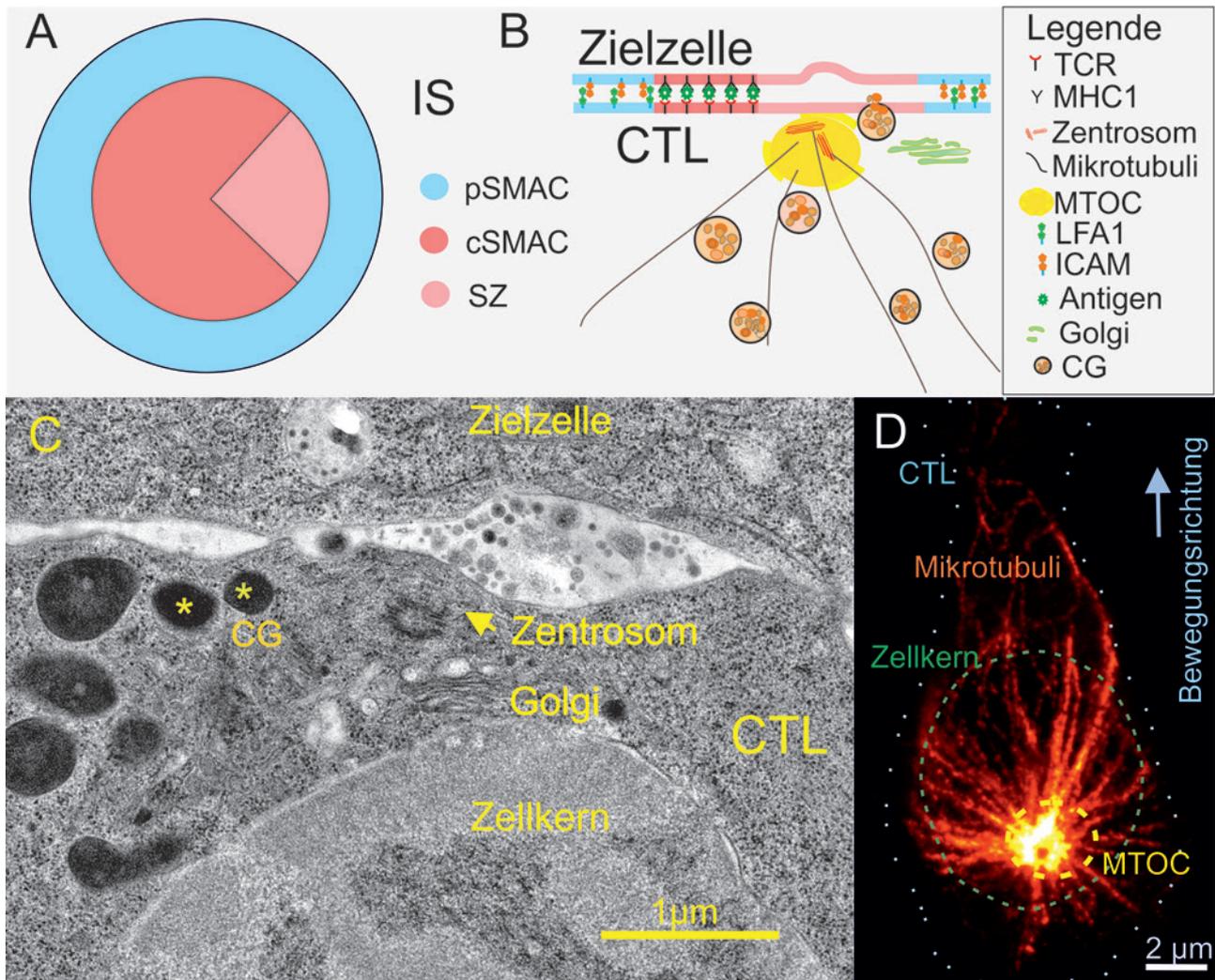


Abb. 2: Wichtige subzelluläre Areale zytotoxischer T-Lymphozyten. **A** Nach Kontakt mit einer Antigen-präsentierenden Zelle bilden zytotoxische T-Lymphozyten eine immunologische Synapse (IS) aus. Die IS lässt sich in den peripheren und zentralen „supramolecular activation cluster“ unterteilen (Blick von oben). Im cSMAC befindet sich die sekretorische Zone (SZ), an der die Fusion der zytotoxischen Granula (CG) erfolgt. **B** CGs werden entlang des Zytoskeletts zur IS transportiert. **C** Eine elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Kontaktstelle zur Zielzelle (IS) sowie einige CGs, die entlang des Zentrosoms (MTOC) zur IS transportiert wurden. **D** Stimulated emission depletion (STED) Aufnahme einer primären CTL mit angefärbten Mikrotubuli und Zentrosom (MTOC).

munantwort. Umgekehrt ist die Erkennung körperfremder Peptide durch die T-Zell-Rezeptoren hochspezifisch und triggert die nachfolgende Kaskade, an deren Ende das Abtöten der Antigen-präsentierenden Zelle durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen aus CG steht.

Bindung der T-Zell-Rezeptoren (TCR) führt zunächst zu einer Stärkung der Kontaktstelle durch Interaktion der Adhäsionsmoleküle LFA1 (CTL) und ICAM1 (Zielzelle).

Wie in Neuronen spielt der Adhäsionsprozess eine Hauptrolle in der Generierung und Erhaltung der Kontaktstelle – genauso wie in der Signalgebung, obwohl der Zielzellerkennung in CTLs wenig mit der Zielerkennung in Neuronen gemeinsam hat. Im Gegensatz zur neuronalen

synaptischen Entwicklung gibt es hier keine Organisation der postsynaptischen Antwort. Die Induktion des Zelltods erfolgt durch die Internalisierung des zytotoxischen Moleküls Granzym, welche durch die gleichzeitig freigesetzten Proteine Granulysin und Perforin erleichtert wird.

Es bildet sich ein sogenannter „supramolecular activation cluster (SMAC)“, wobei der T-Zell-Rezeptor das Zentrum besetzt (central SMAC; cSMAC) und die Adhäsionsmoleküle kreisförmig darum angeordnet sind (peripheral SMAC; pSMAC). Die Konzentration der T-Zell-Rezeptoren im cSMAC lockt Signalmoleküle wie Kinasen an und führt über Aktivierung von Phospholipasen zur Bildung von DAG und IP₃. Das gebildete IP₃ induziert die Entleerung

der Ca^{2+} -Speicher im ER und führt zur Aktivierung der CRAC (calcium release-activated calcium)-Kanäle in der Plasmamembran. Der resultierende Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration initiiert nun eine starke Polarisierung der T-Zelle und den zielgerichteten Transport der CGs und anderer Vesikel zur IS. Zunächst transloziert das Centrosom („microtubule organizing center (MTOC)“) vom der Zielzelle abgewandten Ende der Zelle zu einer Position unmittelbar unterhalb der IS. Ausgehend vom MTOC findet nun eine Polymerisation sowohl von Aktin als auch von Tubulin statt (Abb. 3). Aktinpolymerisation überbrückt den finalen Transport der CGs zur IS. Die Tubulin-Polymerisation ermöglicht die Projektion der Mikrotubuli ins Innere der Zelle. Entlang dieses entstandenen Zytoskeletts werden nun mittels Dynein- und Myosin-abhängigen Transport diverse Vesikelarten in sequenzieller Weise zur IS gebracht.

Die ersten Vesikel, die innerhalb der ersten Minute nach Zellkontakt eintreffen, sind Rab11-positive Recycling-Endosomen. Befunde aus unserem Labor konnten zeigen, dass diese Recycling-Endosomen essenziell für den Transport von Cargo sind, der später für das Docking, Priming und die Fusion zytotoxischer Granula benötigt wird (Marshall et al., 2015). Zu den identifizierten Proteinen auf Recycling-Endosomen, die in VAMP8-abhängiger Weise mit der Plasmamembran an der IS fusionieren, gehören Syntaxin11 und Munc13-4. Die plasmamembranständigen SNARE- und SNARE-assoziierte Proteine akkumulieren in einem Teil des cSMAC und bilden die sogenannte Sekretionsdomäne. Ähnlich wie bei der aktiven Zone in neuronalen Synapsen findet ausschließlich in diesem Bereich Docking, Priming und Fusion zytotoxischer Granula statt. Die ersten CGs erreichen die IS wenige Minuten nach Kontaktbildung, und die Fusion von durchschnittlich 1-2 Granula/CTL ist etwa 15 Minuten nach Kontaktbildung abgeschlossen.

Docking, Priming und Fusion zytotoxischer Granula in CTLs

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind Teil des adaptiven Immunsystems und töten Antigen-präsentierende Zellen durch die Freisetzung der zytotoxischen Substanzen Perforin und Granzym aus zytotoxischen Granula. CGs sind mit Lysosomen-verwandte Organellen, die etwas größer sind als LDCVs von Chromaffinzellen und ebenfalls einen dichten Kern aus Proteinen enthalten. Nahezu sämtliches Wissen über die molekularen Mechanismen von Docking, Priming und Fusion zytotoxischer Granula basiert auf leta-

ren Immunerkrankungen wie dem Griscelli-Syndrom oder der familiären hämophagozytischen Lymphohistiozytose (FHL) (Janka, 2012; de Saint Basile et al., 2010).

Patienten mit Griscelli-Syndrom Typ2 haben Mutationen im GTP-bindenden Protein Rab27a und zeigen neben Albinismus eine Immunschwäche, die ohne Knochenmarktransplantation tödlich verläuft. In CTLs interagiert Rab27a mit MyosinV und sorgt für das korrekte Docking von CGs an der Plasmamembran der IS. Darüber hinaus interagiert Rab27a mit Munc13-4, einem Mitglied der Munc13-Familie. Wie seine Isoformen in ZNS und im neuroendokrinen System ist Munc13-4 für das Priming zytotoxischer Granula verantwortlich. Mutationen im Munc13-4 Gen führen zur ebenfalls tödlich verlaufenden Immunschwäche FHL Typ 3, da CTLs dieser Patienten keine Zielzellen mehr abtöten können (Ménager et al., 2007). Auch Mutationen in Munc18-2 führen zu FHL, in diesem Fall Typ 5, und sind auf die bereits in neuronalen Synapsen beschriebene Funktion von Munc18 beim Docking-Prozess zurückzuführen. Die Fusion zytotoxischer Granula wird, ebenso wie die Exozytose von LDCVs in Chromaffinzellen, durch SNARE-Proteine vermittelt. Auch in diesem Fall wurde ein plasmamembranständiges SNARE-Protein, Syntaxin11, durch menschliche Mutationen, die zu FHL Typ 4 führen, identifiziert (Kögl et al., 2013). Weitere Komponenten des fusions-vermittelnden SNARE-Komplexes sind Synaptobrevin2 auf der Vesikelmembran sowie vermutlich SNAP-23 in der Plasmamembran. Im Gegensatz zu neuronalen Synapsen ist an der immunologischen Synapse bisher ungeklärt, ob Synaptotagmin oder andere Ca^{2+} -bindende Proteine beim eigentlichen Fusionsprozess eine Rolle spielen. Die Übersicht der an Docking, Priming und Fusion von CG beteiligten Proteine verdeutlicht die verblüffende Übereinstimmung mit den molekularen Mechanismen an der neuronalen Synapse (Abb. 3) (Becherer et al., 2012).

Synapsenabbau

In ihrer Funktion als „serial killer“ müssen CTLs in der Lage sein, ihre Synapsen nach erfolgreicher Fusion von CGs schnell abzubauen. Deshalb erfolgt bereits 15-30 Minuten nach Etablierung des ersten Kontakts mit einer Antigen-präsentierenden Zelle der koordinierte Abbau der IS. Die Lebenszeit einer immunologischen Synapse ist viel kürzer als die einer neuronalen Synapse, obwohl in beiden Synapsen das Wiederverwerten der Vesikelbestandteile wichtig ist für ihre Funktion. T-Zell-Rezeptoren sowie an der Fusion beteiligte, integrale Plasmamembran-Pro-

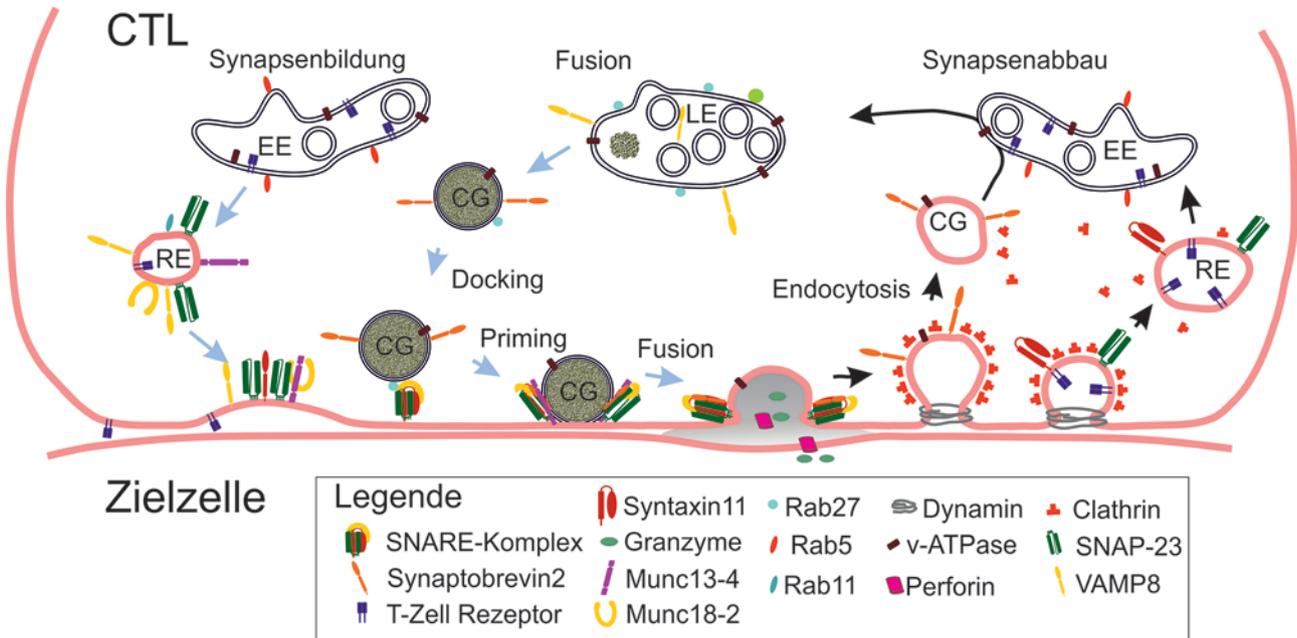


Abb. 3: Synapsenbildung, Synapsenfunktion und Synapsenabbau in zytotoxischen T-Lymphozyten. Links: Die Bildung der immunologischen Synapse (IS) startet mit der Abschnürung von Recycling-Endosomen von frühen Endosomen. Die Recycling-Endosomen werden zur IS transportiert und fusionieren in VAMP8-abhängiger Weise mit der Plasmamembran. Recycling-Endosomen bringen Proteine, die für das spätere Docking, Priming und Fusion der zytotoxischen Granula (CG) benötigt werden, zur IS. Mitte: Nach erfolgter Maturierung über späte Endosomen und Lysosomen polarisieren CGs zur Plasmamembran und werden dort verankert (Docking). Nach dem Priming durch das Protein Munc13-4 vermittelt der SNARE-Komplex die Fusion. Rechts: Entleerte CGs werden durch Endozytose in das Zellinnere gebracht und verschmelzen dort mit frühen Endosomen.

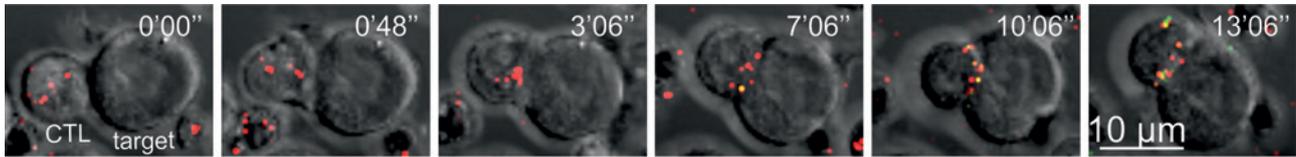
teine wie Syntaxin11 werden über Recycling-Endosomen in das Zellinnere zurückgeholt und entweder degradiert oder auf Stufe der frühen Endosomen in den Recycling-Pathway eingespeist.

Auch die Membrankomponenten von CGs werden im Rahmen des Synapsenabbaus wiederverwertet. Wie wir kürzlich mithilfe einer Synaptobrevin2-mRFP Knockin-Maus zeigen konnten, erfolgt das Recycling jedoch nicht über Recycling-Endosomen, sondern über einen unabhängigen Weg (Chang et al., 2016). Synaptobrevin2, das für die CG Fusion verantwortliche vSNARE (Matti et al., 2013), bleibt unmittelbar nach der Fusion in Clusters an der Plasmamembran und kann mit einem monoklonalen Antikörper gegen den luminalen (intravesikulären) Bereich des Proteins detektiert werden (Abb. 4). Innerhalb weniger Minuten wird Synaptobrevin2, zusammen mit weiteren CG Membranproteinen, wie z. B. der vesikulären H^+ -ATPase, an der IS endozytiert. Wie die Endozytose synaptischer Vesikel in Neuronen (Soykan et al., 2016), ist auch die Endozytose der CG in CTLs durch Clathrin und Dynamin vermittelt. Des Weiteren spielt das Synaptobrevin2-spezifische Adapterprotein CALM (Koo et al., 2011) eine essenzielle Rolle. Nach erfolgter Endozytose werden die CGs angesäuert und gelangen über frühe endosoma-

le Kompartimente in späte Endosomen. Hier werden sie erneut mit zytotoxischen Komponenten wie Granzym B befüllt und stehen nach diversen Maturierungsschritten für weitere Fusionsprozesse an neugebildeten Synapsen zur Verfügung. Etwa 50% der Killing-Effizienz, die CTLs auszeichnet, wird durch das effiziente Recycling von CG-Membranproteinen erreicht. Der Synapsenabbau inklusive der Endozytoseprozesse ist dabei schnell genug, um bereits nach wenigen Minuten erneut eine neue IS bilden und weitere Antigen-präsentierende Zellen abtöten zu können (Chang et al., 2016).

Fazit

Die immunologische Synapse zwischen zytotoxischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen besitzt viele Ähnlichkeiten mit den neuronalen Synapsen im zentralen Nervensystem. Zusätzlich zur Untersuchung der präsynaptischen Funktion ist in CTLs der Zugang zu den Prozessen der Synapsenbildung und des Synapsenabbaus möglich. Dazu verfügen wir über ein System, das die Erforschung dieser Prozesse mit hochauflösenden live- bildge-



Synaptobrevin2-mRFP anti-RFP488

Abb. 4: Visualisierung der Endozytose zytotoxischer Granula in Echtzeit. Konfokalmikroskopische Aufnahmenserie einer zytotoxischen T Lymphozyte (CTL) in Kontakt mit einer Antigen-präsentierenden Zelle (target). Die zytotoxischen Granula sind durch die endogene Expression von Synaptobrevin2-mRFP rot gefärbt. In der Badlösung befindet sich ein mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markierter anti-Synaptobrevin2 -Antikörper, der nur an das Synaptobrevin2 binden kann, wenn sich dieses nach Vesikelfusion in der Plasmamembran befindet. Die Serie beginnt mit dem Kontakt zwischen CTL und Zielzelle (0'00''), zum Zeitpunkt 3'06'' hat sich eine immunologische Synapse gebildet (erkennbar an der Polarisierung der Granula zur Zielzelle). Im nächsten Bild (7'06'') hat die Fusion einzelner CG stattgefunden, denn der grüne Antikörper bindet an das rote Synaptobrevin2 in der Plasmamembran (gelb). Am Ende der Serie (13'06'') ist zu erkennen, dass mehrere CGs durch Endozytose in das Zellinnere transportiert wurden.

benden Verfahren ermöglicht. Zusammen mit der Verfügbarkeit von primärem Material aus Menschen gibt es also Argumente, die immunologische Synapse als zukünftiges Modellsystem für Aspekte der synaptischen Funktion heranzuziehen.

Abkürzungen

CG	zytotoxisches Granulum
CRAC	„calcium release-activated calcium“
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
FHL	familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose
IS	immunologische Synapse
LDCV	„large dense-core vesicle“
MHC	„major histocompatibility complex“
MTOC	Mikrotubuli Organisations-Zentrum
SMAC	„supramolecular activation cluster“
SNARE	„soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“
TCR	T-Zell Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

Literatur

- Akins, M.R. and Biederer, T. (2006). Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 83–89.
- Becherer, U., Medart, M.R., Schirra, C., Krause, E., Stevens, D. and Rettig, J. (2012). Regulated exocytosis in chromaffin cells and cytotoxic T lymphocytes: how similar are they? *Cell Calcium* 52, 303–312.
- Bury, L.A.D. and Sabo, S.L. (2016). Building a terminal: mechanisms of presynaptic development in the CNS. *Neuroscientist* 22, 372–391.
- Chang, H.-F., Bzeih, H., Schirra, C., Chitrala, P., Halimani, M., Cordat, E., Krause, E., Rettig, J. and Pattu, V. (2016). Endocytosis of cytotoxic granules is essential for multiple

killings of target cells by T lymphocytes. *J. Immunol.* 197, 2473–2484.

- Gundelfinger, E.D., Reissner, C. and Garner, C.C. (2015). Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front. Synaptic Neurosci.* 7, 19.
- Janka, G.E. (2012). Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu. Rev. Med.* 63, 233–246.
- Kögl, T., Müller, J., Jessen, B., Schmitt-Graeff, A., Janka, G., Ehl, S., zur Stadt, U. and Aichele, P. (2013). Hemophagocytic lymphohistiocytosis in syntaxin-11-deficient mice: T-cell exhaustion limits fatal disease. *Blood* 121, 604–613.
- Koo, S.J., Puchkov, D. and Haucke, V. (2011). AP180 and CALM: Dedicated endocytic adaptors for the retrieval of synaptobrevin 2 at synapses. *Cell Logist.* 1, 168–172.
- Man, K.N.M., Imig, C., Walter, A.M., Pinheiro, P.S., Stevens, D.R., Rettig, J., Sørensen, J.B., Cooper, B.H., Brose, N. and Wojcik, S.M. (2015). Identification of a Munc13-sensitive step in chromaffin cell large dense-core vesicle exocytosis. *Elife* 4.
- Marshall, M.R., Pattu, V., Halimani, M., Maier-Peuschel, M., Müller, M.-L., Becherer, U., Hong, W., Hoth, M., Tschernig, T., Bryceson, Y.T. et al. (2015). VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *J. Cell. Biol.* 210, 135–151.
- Matti, U., Pattu, V., Halimani, M., Schirra, C., Krause, E., Liu, Y., Weins, L., Chang, H.F., Guzman, R., Olausson, J. et al. (2013). Synaptobrevin2 is the v-SNARE required for cytotoxic T-lymphocyte lytic granule fusion. *Nat. Commun.* 4, 1439.
- Ménager, M.M., Ménasché, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C.-H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A. and de Saint Basile, G. (2007). Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat. Immunol.* 8, 257–267.
- De Saint Basile, G., Ménasché, G. and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 568–579.
- Soykan, T., Maritzen, T. and Haucke, V. (2016). Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 17–23.
- Stevens, D.R., Schirra, C., Becherer, U. and Rettig, J. (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. *Front. Synaptic Neurosci.* 3, 2.
- Südhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11–25.

De Wit, H., Walter, A.M., Milosevic, I., Gulyás-Kovács, A., Riedel, D., Sørensen, J.B. and Verhage, M. (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell* 138, 935–946.

Anmerkung: Übersetzung der englischen Version des Artikels online verfügbar unter <https://doi.org/10.1515/nf-2016-A052>

Autoreninformationen



Univ.-Prof. Dr. Jens Rettig

Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg
Tel: +49 6841 1616400
Fax: +49 6841 1616402
E-Mail: jrettig@uks.eu

Jens Rettig studierte Biologie und Chemie an der Ruhr-Universität Bochum und promovierte anschließend bei Olaf Pongs am Zentrum für molekulare Neurobiologie in Hamburg über beta-Untereinheiten spannungsabhängiger Kalium-Kanäle. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der University of Washington in Seattle bei Bill Catterall leitete er eine Nachwuchsgruppe in der Abteilung von Erwin Neher am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Seit 2000 ist er Professor für Physiologie an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg. Momentan fungiert er dort als einer von zwei Gründungsdirektoren des Centrums für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) sowie als Sprecher des SFB 894 „Ca²⁺-Signale: Molekulare Mechanismen und Integrative Funktionen“. Seit 2008 ist er Mitglied der Deutschen Akademie der Wissenschaften Leopoldina und seit 2009 Mitglied des Councils der „International Union of Physiological Sciences (IUPS)“.



David R. Stevens

Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg
Tel: +49 6841 1616405
Fax: +49 6841 1616402
E-Mail: david.stevens@uks.eu

David R. Stevens studierte Biologie an der Texas A&M University und promovierte danach an der University of Texas in Galveston über GABAerge Transmission im lateralen Septum. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der University of California in Irvine bei Carl Cotman arbeitete er als Instructor an der Harvard Medical School im Department of Psychiatry. Anschließend wechselte er als wissenschaftlicher Mitarbeiter an die Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf bei Helmut Haas, um dann an der Universität des Saarlandes mit Bernd Lindemann an Geschmacksrezeptoren zu arbeiten. Seit 2001 leitet er eine Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Zelluläre Neurophysiologie der Universität des Saarlandes.

Jens Rettig* and David R. Stevens

Synaptic Transmission in the Immune System

<https://doi.org/10.1515/nf-2016-A052>

Abstract: The release of neurotransmitters at synapses belongs to the most important processes in the central nervous system. In the last decades much has been learned about the molecular mechanisms which form the basis for this fundamental process. Highly regulated exocytosis, based on the SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptor) complex and its regulatory molecules is the signature specialization of the nervous system and is shared by neurons and neuroendocrine cells. Cells of the immune system use a similar mechanism to release cytotoxic materials from secretory granules at contacts with virally or bacterially infected cells or cancer cells, in order to remove these threats. These contact zones have been termed immunological synapses in reference to the highly specific targeted exocytosis of effector molecules. Recent findings indicate that mutations in SNARE or SNARE-interacting proteins are the basis of a number of devastating immunological diseases. While SNARE complexes are ubiquitous and mediate a wide variety of membrane fusion events it is surprising that in many cases the SNARE proteins involved in immunological synapses are the same molecules which mediate regulated exocytosis of transmitters and hormones in neurons and neuroendocrine cells. These similarities raise the possibility that results obtained at immunological synapses may be applicable, in particular in the area of presynaptic function, to neuronal synapses. Since immunological synapses (IS) are assembled and disassembled in about a half an hour, the use of immune cells isolated from human blood allows not only the study of the molecular mechanisms of synaptic transmission in human cells, but is particularly suited to the examination of the assembly and disassembly of these “synapses” via live imaging. In this overview we discuss areas of similarity between synapses of the nervous and immune systems and in the process will refer to results of our experiments of the last few years.

*Corresponding author: Jens Rettig, Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg, Germany, Mail: jrettig@uks.eu

David R. Stevens, Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg, Germany, Mail: david.stevens@uks.eu

Keywords: Chromaffin cells; immunological synapse; SNARE-Proteins; cytotoxic T-lymphocytes

Introduction

A synapse (gr. syn “together” and haptein “grasping”) refers to the contact between two neurons at which, by the release of chemical messengers, information is transmitted. It is typically divided into a presynapse, a synaptic cleft and a postsynapse. A huge number of synapses (10^{13}) in humans occur between neurons of the central nervous system where they provide the foundation of plastic processes such as learning, memory and dementia. Beta cells in the pancreas and chromaffin cells of the adrenal gland use similar mechanisms to release the hormones insulin and adrenalin, respectively, which then circulate via the blood stream and affect many target cells in the entire body. Both natural killer cells of the innate immune system and T-lymphocytes of the adaptive immune system build, in the hunt for pathogens, highly specific contact zones with antigen-presenting cells. These contact zones are the site of targeted release of cytotoxic substances which kills these cells and have been named immunological synapses. Genetic studies in patients with immune-deficiencies indicate that release of cytotoxic substances at immunological synapses is astonishingly similar to release of messengers at neuronal synapses and neuroendocrine cells.

Though referred to as synapses, there are important differences between immunological synapses and neuronal synapses. There is little similarity between target cell recognition by T-lymphocytes, discussed below, and the recognition process at neuronal synapses, a fascinating area (Akins and Biederer, 2006) that is beyond the scope of this article. We will concentrate on presynaptic mechanisms since immunological synapses have no requirement for generating postsynaptic structures, a requirement for true synapses. The adrenal chromaffin cell, which we use as a model for regulated exocytosis, makes no contact with its target cells.

Both neurons and chromaffin cells generate large reserves of vesicles and presynaptic machinery which organizes transfer of vesicles to the releasable pools via docking and priming. T-lymphocytes lack a reserve pool *per se* and do not maintain a releasable pool which is discussed below. T-lymphocytes do, however, express components of

the fusion machinery and do carry out docking and priming steps.

In the last decade, mutation of the proteins Syntaxin11, Munc13-4, Munc18-2a and und Rab27a have been shown to result in loss of immunological synapse function, which lead to lethal immune diseases (Janka, 2012). These results indicate fundamental similarities between release from lymphocytes, neuronal and neuroendocrine cells. In contrast to synapses in the CNS and neuroendocrine tissue, immunological synapses are built within 30 minutes and are rapidly disassembled so that new targets can be acquired. Thus, in addition to study of synapse function, study of the assembly and disassembly of these synapses with high resolution methods is possible. The availability of human material from donor blood allows use of lymphocytes and study of the immunological synapse provides results which may be extended to neuronal synapses. In the case of the presynaptic organization of release and recycling of the release machinery, this appears to be the case. In this overview we briefly summarize the processes of assembly, release and disassembly at immunological synapses and will discuss similarities and differences of these processes to those in chromaffin cells.

Assembling the Synapse

Neuronal synapses form in response to intercellular interactions of adhesion molecules (Akins and Biederer, 2006). Both neuroligins and SynCAM1 have been reported to serve as markers for postsynaptic targets. When neurons come in contact with either marker, even when it is present in non-neuronal cells, presynaptic specialization is induced in the neuron. Adhesion molecules cluster at these contact points and attract other associated molecules such as those involved in active zone formation. The molecules involved in the active zone and in the release machinery interact with binding sites located on the cytosolic tails of adhesion molecules and with each other. In both neurons and chromaffin cells, large multi-domain proteins related to Bassoon and Piccolo act as scaffolds and thus organize the structures which transfer vesicles from the large reserve pool to the docking and priming apparatus (Gundelfinger et al., 2015). These organizing molecules are delivered to the presynaptic compartment as passengers on transport vesicles containing active zone components such as piccolo, bassoon, syntaxin, RIM, Munc-18, ELKS2/CAST, SNAP-25 and n-cadherin. These vesicles travel along microtubules (Bury and Sabo, 2016). These active zone molecules and their transport vesicles

are generated in the soma, as are synaptic vesicles and LDCVs. In the case of neurons, the transport in axons may be over long distances. In neuroendocrine cells such as chromaffin cells the transport distance is much shorter, but the organizing principles are similar.

The active zone proteins not only organize docking and priming, but also attract the voltage-dependent calcium channels required for stimulated release. It has been difficult to assign specific functions to individual molecules. Studies examining single knockout or knockdown have produced surprisingly modest phenotypes (Südhof, 2012). It may be that the multiple interactions of these multi-domain proteins produce a functional redundancy, in particular in tissue that has already gone through development.

Chromaffin cells of the adrenal medulla control important physiological parameters such as blood pressure and heartbeat via secretion the catecholamines, adrenalin and noradrenaline. The catecholamines are stored in large dense core vesicles (LDCVs) which go through a series of maturation steps (Fig.1.). The biogenesis of granules is beyond the scope of this overview. The V-SNARE synaptobrevin and synaptotagmins are acquired, along with Rab3, synaptophysin, vATPase, and the neurotransmitter transporter (VMAT in the case of chromaffin cells), during trafficking through trans-Golgi and endosomal compartments, where many of these components are recycled. After transport to the plasma membrane, the LDCVs undergo a docking process which anchors them at the plasma membrane. Chromaffin cells provide a model allowing study of the presynaptic processes involved in the release of catecholamines via LDCVs.

Docking, Priming and Fusion of LDCVs in Chromaffin Cells

The docking complex is initiated by an interaction between the two SNARE-proteins Syntaxin1 and SNAP-25, which bind to the plasma membrane, and a vesicle-associated protein, Synaptotagmin (de Wit et al., 2009). The availability of Syntaxin1 and thereby the efficiency of the docking process is regulated by Munc18. The docked LDCV is not yet fusion competent and must go through an additional maturation step, the so-called priming step. Munc13s are absolutely necessary for priming at most synapses. They catalyze the assembly of the SNARE complex which is composed of Syntaxin1, SNAP-25 und the vesicle-associated SNARE-protein Synaptobrevin2. Munc13s have recently been proposed to have a priming function in

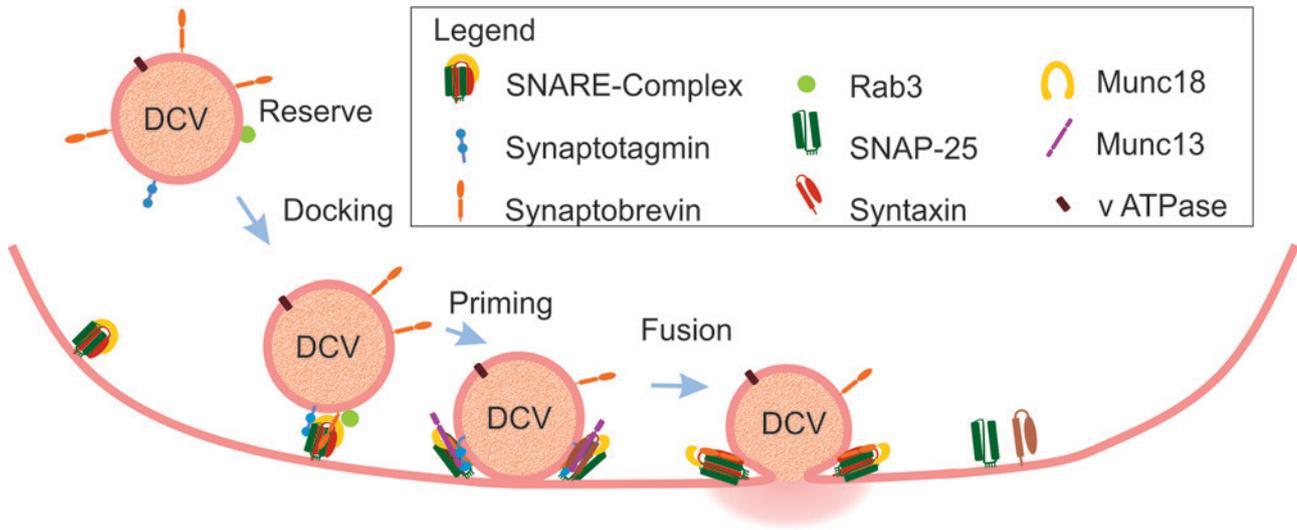


Fig. 1: Synapse function in chromaffin cells of the adrenal gland. The important maturation steps of LDCVs and the proteins involved are shown. LDCVs from the reserve pool in the cytoplasm are transported to the plasma membrane via the cytoskeleton and bind with docking molecules. These docked LDCVs are then primed to fusion competence and finally, following calcium entry, fuse with the plasma membrane and release their cargo of catecholamines.

chromaffin cells as well (Man et al., 2015). The assembly of the SNARE complex renders the LDCVs fusion-competent, and after entry of calcium at the presynapse and the binding of calcium to Synaptotagmin, drives the fusion of LDCVs with the plasma membrane resulting in release of catecholamines. Other proteins such as Complexin and CAPS are, in addition, involved in the regulation of docking, priming and fusion of LDCVs in chromaffin cells (Stevens et al., 2011).

Assembling the Immunological Synapse in CTLs

Cytotoxic T-lymphocytes patrol throughout the entire body in search of infectious pathogens. They are transported in the blood stream, penetrate blood vessel walls and migrate through all organs of the body. If CTLs discover infected tissue they can, after activation, kill a large number of target cells, one after the other. This is referred to as “serial killing”. Thus it is obvious that precise recognition of target cells is essential, since CTLs should only kill those cells which present foreign peptides. This requirement leads to one of the great contrasts between chromaffin cells, which produce a large pool of releasable LDCVs, and CTLs, which contain only a few mature CGs which they deliver to the IS on demand.

The assembly of the IS begins with the recognition of foreign antigen on the surface of the target cell by T-cell receptors of the CTL (Fig. 2). The presentation is carried out via the MHC (major histocompatibility complex), which binds peptides resulting from protein degradation by the proteasome, in the endoplasmic reticulum, and presents them after transporting them to the cell surface. The vast majority of presented peptides is not foreign and will not elicit an immune response. The recognition of foreign peptides by T-cell receptors is highly specific and triggers the cascade described below, which ends in the killing of the antigen-presenting cell after release of cytotoxic substances from the CG.

Binding of the T-cell receptors (TCRs) to antigen leads to a rapid strengthening of the contact due to binding of the adhesion molecules LFA1 (CTL) and ICAM1 (target cell). Thus, as in neurons, the process of adhesion itself plays a major role in generation and maintenance of the contact zone as well as in signaling, although the recognition of target cells in CTLs has little in common with target recognition in neurons. In contrast to neuronal synapse development, there is no requirement for the organization of a postsynaptic response. The induction of cell death follows internalization of the cytotoxic molecule Granzyme, which is facilitated by co-released Granulysins and Perforin.

The “supramolecular activation cluster (SMAC)” forms with TCRs populating the central (cSMAC) area surrounded by adhesion molecules in a ring-shaped pe-

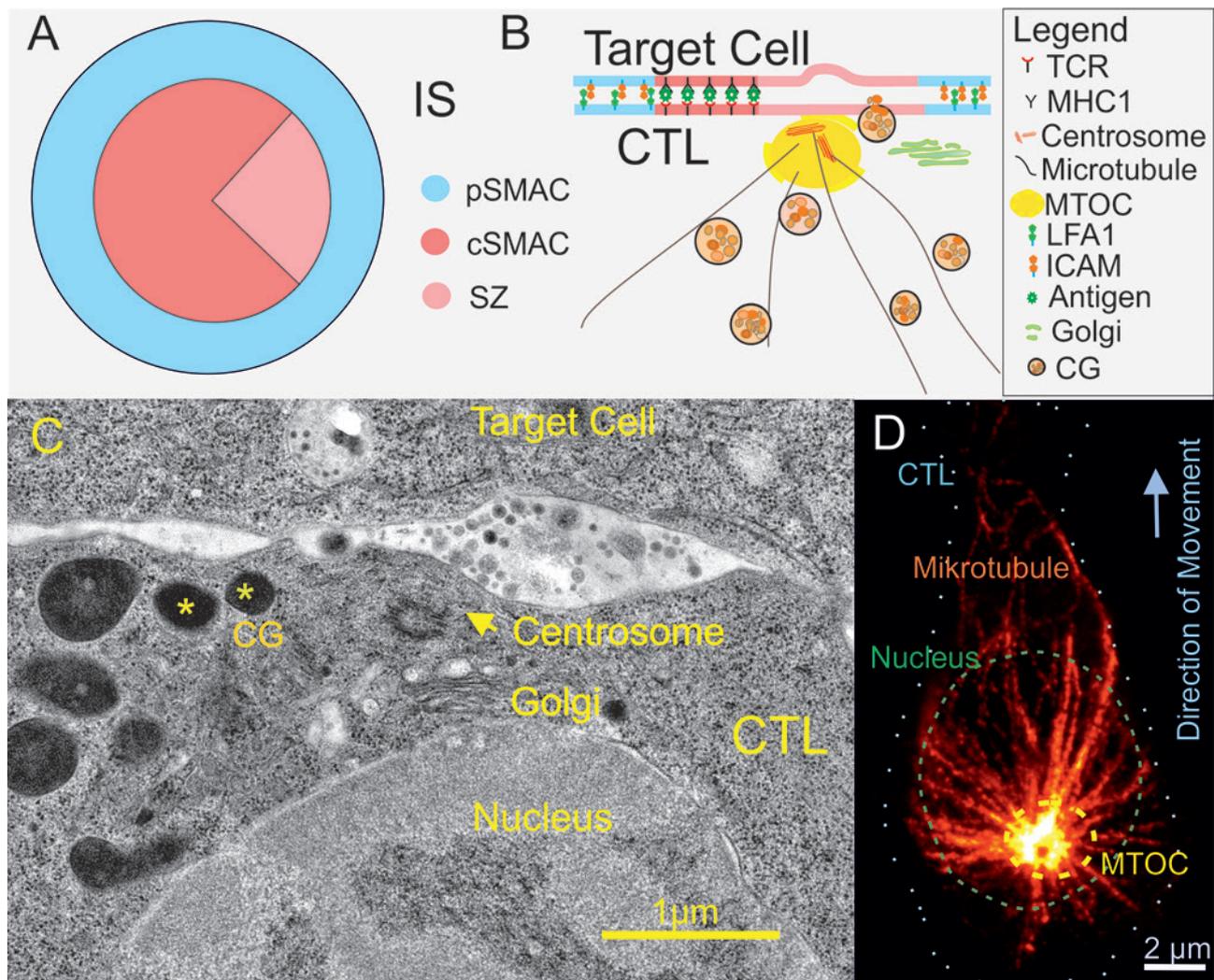


Fig. 2: Important structures of the Immunological synapse. **A** After contact with an antigen presenting cell, cytotoxic T-lymphocytes generate an immunological synapse (IS). Shown is a “birds eye view” cartoon of the contact area. The IS can be divided into a peripheral and a central “supramolecular activation cluster”. In the cSMAC there is a secretory zone (SZ) where fusion of cytotoxic granules (CGs) occurs. **B** CGs are transported along the cytoskeleton to the IS which is built at the contact zone between the CTL and its target. This area is rich in adhesion and signaling molecules (see text). **C** An electron microscopic image of the contact between CTL and target cell (IS) including two CGs which are being transported to the IS, the centrosomes and Golgi. **D** Stimulated emission depletion (STED) image of a primary CTL with marked microtubules and centrosome (MTOC).

ripheral (pSMAC) area. The concentration of TCRs attracts signal molecules including kinases which, by activating phospholipases, lead to production of DAG and IP_3 . The IP_3 initiates emptying of the Ca^{2+} stores of the ER which leads to activation of calcium-release activated calcium (CRAC) channels in the plasma membrane. The resulting sustained increase in the intracellular Ca^{2+} concentration initiates an impressive polarization of the CTL and the targeted transport of CGs and other organelles to the IS. Initially the centrosome (referred to as “microtubule organizing center” (MTOC)) moves from its position trailing the nucleus (in migrating CTLs) to a position directly ad-

acent to the IS. Both actin and tubulin polymerization are required for movement of the MTOC (Fig. 3). Actin polymerization is required for final delivery of CGs to the IS.

Tubulin polymerization allows projection of the microtubules to the cell interior. Dynein- and Myosin-mediated transport along this cytoskeletal network produces sequential delivery of a variety of vesicles types to the IS. The first to arrive, within the first minute, are Rab11 positive recycling endosomes (RE). Results from our laboratory show that REs are essential for the transport of cargo that is later necessary for the docking, priming and fusion of CGs (Marshall et al., 2015). Among the identified pro-

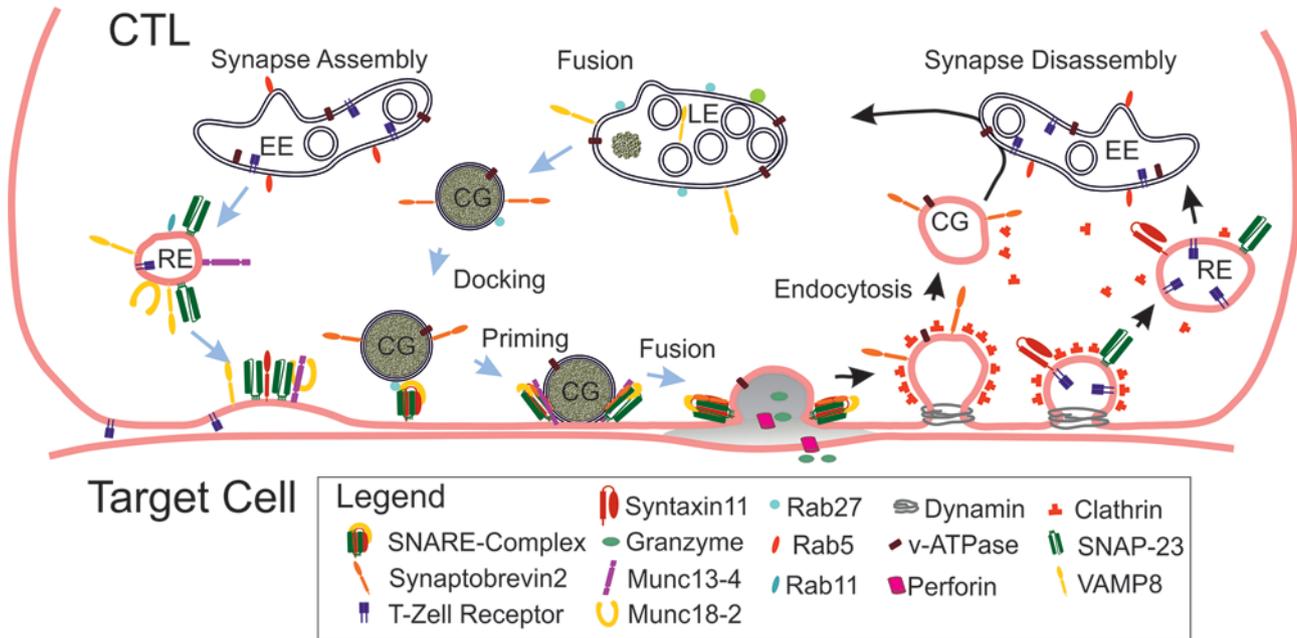


Fig. 3: Synapse assembly, function and disassembly in cytotoxic T-lymphocytes. The assembly of the immunological synapse (IS, left) begins with the fission of recycling endosomes (RE) from the early endosomes (EE). The RE are transported to the IS and fuse (VAMP8-dependent) with the plasma membrane. REs deliver proteins which are required for subsequent docking, priming and fusion of cytotoxic granules (CG). After maturation via late endosomes and lysosomes, CGs (middle) are delivered to the plasma membrane where they anchor (docking). After priming under control of Munc13-4, the SNARE complex drives membrane fusion. Recycling CGs are returned to the cytoplasm via endocytosis (right) where they fuse with the EE and are then trafficked to the LE.

teins of these REs which fuse with the plasma membrane at the IS in a VAMP8 dependent manner, are Syntaxin11 and Munc13-4. The plasma membrane-bound SNARE and SNARE-associated proteins accumulate in an area of the cSMAC and build the secretory zone (SZ). As is the case in the active zone of neuronal synapses, docking, priming and fusion of CGs occurs exclusively at the SZ. The first CGs reach the IS a few minutes after establishment of contact and the fusion of an average of one to two CGs at the synapse is complete within 15 minutes.

Docking, Priming and Fusion of Cytotoxic Granules in CTLs

Cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) are a part of the adaptive immune system, and kill antigen-presenting cells by releasing the cytotoxic proteins Perforin and Granzyme B from cytotoxic granules (CGs). CGs are lysosome-related organelles which are somewhat larger than LDCVs of chromaffin cells and also contain a dense proteinaceous core. Much of what we know about the molecular mechanisms of docking, priming and fusion of CGs is based on lethal immune diseases such as Griscelli Syndrome or familial

hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL, (Janka, 2012; de Saint Basile et al., 2010).

Patients with Griscelli Syndrome type 2 have mutations in the GTP-binding protein Rab27a and display albinism and an immune deficit that is fatal if not treated by bone-marrow transplantation. Rab27a interacts with MyosinV in CTLs and is required for correct docking of CGs at the plasma membrane of the IS. In addition, Rab27 interacts with Munc13-4, a member of the Munc13 family. Like its isoforms in the CNS and in neuroendocrine cells, Munc13 is responsible for priming in CGs. Mutation of the Munc13-4 gene leads to the fatal immune disease FHL type 3, since the CGs of these patients are unable to fuse and therefore their CTLs cannot kill target cells (Ménager et al., 2007). Mutations in Munc18-2 also lead to an FHL, in this case type 5, which is the result of the loss of the docking function previously described for Munc18 in neuronal synapses. The fusion of CGs is driven by the SNARE complex, as is the exocytosis of LDCVs in chromaffin cells. In CG fusion a membrane bound SNARE, Syntaxin11, whose mutation leads to FHL type 4, has also been identified via human mutation (Kögl et al., 2013). Further components of the fusion-driving SNARE complex of CGs are Synaptobrevin2 on the CG membrane and probably SNAP-23 in the plasma membrane. In contrast to chromaffin cell synapses

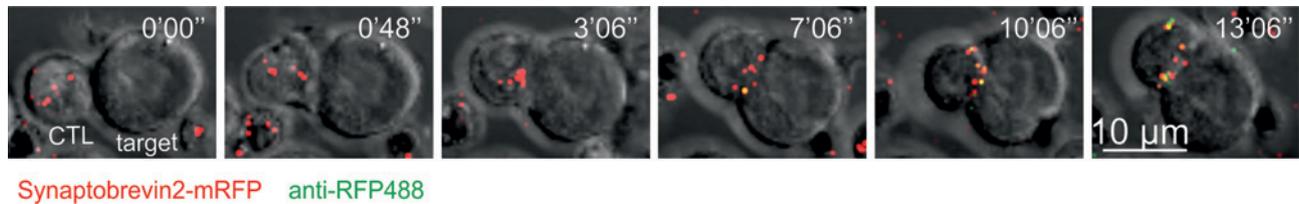


Fig. 4: Live visualization of endocytosis of cytotoxic granules. Confocal microscopic images of a cytotoxic T-lymphocyte in contact with an antigen presenting cell (target). The CGs are red due to expression of Synaptobrevin2-mRFP. The chamber medium contains an antibody against mRFP which is bound to a green fluorescent dye. This antibody can only bind synaptobrevin2 after CG exocytosis, when it is exposed on the cell surface. The series begins with contact between CTL and the target cell (0'00''), at time 3'06'', the IS has formed as evidenced by the polarization of the red CGs to the contact site. In the next image (7'06'') fusion of CGs has occurred as shown by the green puncta which result from binding of the green-marked mRFP antibody on the red marked Synaptobrevin2-mRFP exposed to the medium (yellow). At the end of the series (13'06'') several CGs have been endocytosed and transported to the cell interior.

es, it is still not clear if Synaptotagmin or another calcium binding protein play a role in the actual fusion event. This description of the proteins involved in docking, priming and fusion of CGs indicates their remarkable similarity to the molecular mechanisms at the neuronal synapse (Fig. 3) (Becherer et al., 2012).

Synapse Disassembly

In their function as “serial killers”, CTLs must be able to rapidly disassemble their synapses. The coordinated disassembly of the IS follows within 15-30 minutes after initial contact with the antigen-presenting cell. The lifetime of the immunological synapse is much shorter than that of a neuronal synapse, though in both cases recycling of vesicle components is necessary for function. Though many details are not completely understood, this disassembly can be divided into two processes. T-cell receptors and membrane bound proteins such as Syntaxin11, which are involved in fusion, are internalized via REs and either degraded or delivered to the early endosomes (EE) and recycled.

The membrane components of CGs are also recycled as part of the disassembly process. As we recently demonstrated using a Synaptobrevin2-mRFP knockin mouse, recycling of CG components is independent of the recycling endosomes (Chang et al., 2016). Synaptobrevin2, the vSNARE responsible for CG fusion (Matti et al., 2013) is present in clusters at the plasma membrane immediately after fusion and can be detected with a monoclonal antibody directed at the luminal (intravesicular) mRFP (which is exposed to the extracellular medium at exocytosis, Fig. 4). Within a few minutes, Synaptobrevin2 along with other CG membrane proteins such as the vesicular H⁺-ATPase are endocytosed at the IS. Like the endocytosis

of synaptic vesicles in neurons (Soykan et al., 2016) the endocytosis of CG components at the IS depends on Clathrin and Dynamin. In addition, the Synaptobrevin2-specific adaptor protein CALM (Koo et al., 2011) plays an essential role. CGs are acidified after endocytosis and reach the late endosomes via the early endosomes, where they reacquire cytotoxic components such as Granzyme B. Following a series of maturation steps, CGs become available for further fusion at newly built synapses. Approximately 50% of the killing capacity of CGs is achieved by the efficient recycling of CG membrane proteins. The disassembly of synapses including endocytosis is fast enough to allow new IS assembly and killing of antigen presenting cells within a few minutes (Chang et al., 2016).

Conclusion

The immunological synapse between cytotoxic T-lymphocytes and antigen-presenting cells has many similarities to neuronal synapses in the CNS. However, in addition to the study of the mechanisms of presynaptic function, in CTLs we have experimental access to the processes of assembly and disassembly, and a system amenable to high-resolution live imaging. Together with the availability of primary human material, these are good arguments for consideration of the immunological synapse in the future as a model system for some aspects of synaptic function.

Abbreviations

CG	cytotoxic granule
CRAC	calcium release-activated calcium
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
FHL	familial hemophagocytic lymphohistiocytosis

IS	immunological synapse
LDCV	large dense-core vesicle
MHC	major histocompatibility complex
MTOC	microtubule organizing center
SMAC	supramolecular activation cluster
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TCR	T-cell receptor
CNS	central nervous system

References

- Akins, M.R., and Biederer, T. (2006). Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16, 83–89.
- Becherer, U., Medart, M.R., Schirra, C., Krause, E., Stevens, D., and Rettig, J. (2012). Regulated exocytosis in chromaffin cells and cytotoxic T lymphocytes: how similar are they? *Cell Calcium* 52, 303–312.
- Bury, L.A.D., and Sabo, S.L. (2016). Building a terminal: mechanisms of presynaptic development in the CNS. *Neuroscientist* 22, 372–391.
- Chang, H.-F., Bzeih, H., Schirra, C., Chitirala, P., Halimani, M., Cordat, E., Krause, E., Rettig, J., and Pattu, V. (2016). Endocytosis of cytotoxic granules is essential for multiple killing of target cells by T lymphocytes. *J Immunol* 197, 2473–2484.
- Gundelfinger, E.D., Reissner, C., and Garner, C.C. (2015). Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 7, 19.
- Janka, G.E. (2012). Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu Rev Med* 63, 233–246.
- Kögl, T., Müller, J., Jessen, B., Schmitt-Graeff, A., Janka, G., Ehl, S., zur Stadt, U., and Aichele, P. (2013). Hemophagocytic lymphohistiocytosis in syntaxin-11-deficient mice: T-cell exhaustion limits fatal disease. *Blood* 121, 604–613.
- Koo, S.J., Puchkov, D., and Haucke, V. (2011). AP180 and CALM: Dedicated endocytic adaptors for the retrieval of synaptobrevin 2 at synapses. *Cell Logist* 1, 168–172.
- Man, K.N.M., Imig, C., Walter, A.M., Pinheiro, P.S., Stevens, D.R., Rettig, J., Sørensen, J.B., Cooper, B.H., Brose, N., and Wojcik, S.M. (2015). Identification of a Munc13-sensitive step in chromaffin cell large dense-core vesicle exocytosis. *Elife* 4.
- Marshall, M.R., Pattu, V., Halimani, M., Maier-Peuschel, M., Müller, M.-L., Becherer, U., Hong, W., Hoth, M., Tschernig, T., Bryceson, Y.T., et al. (2015). VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *J Cell Biol* 210, 135–151.
- Matti, U., Pattu, V., Halimani, M., Schirra, C., Krause, E., Liu, Y., Weins, L., Chang, H.F., Guzman, R., Olausson, J., et al. (2013). Synaptobrevin2 is the v-SNARE required for cytotoxic T-lymphocyte lytic granule fusion. *Nat Commun* 4, 1439.
- Ménager, M.M., Ménasché, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C.-H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2007). Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* 8, 257–267.
- De Saint Basile, G., Ménasché, G., and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol* 10, 568–579.
- Soykan, T., Maritzen, T., and Haucke, V. (2016). Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Curr Opin Neurobiol* 39, 17–23.
- Stevens, D.R., Schirra, C., Becherer, U., and Rettig, J. (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 3, 2.
- Südhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11–25.
- De Wit, H., Walter, A.M., Milosevic, I., Gulyás-Kovács, A., Riedel, D., Sørensen, J.B., and Verhage, M. (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell* 138, 935–946.

Article note: German version available at <https://doi.org/10.1515/nf-2016-0052>

Bionotes



Univ.-Prof. Dr. Jens Rettig

Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg, Germany
 Phone: +49 6841 1616400
 Fax: +49 6841 1616402
 Mail: jrettig@uks.eu

Jens Rettig studied biology and chemistry at the Ruhr University in Bochum, Germany and received a doctorate in the laboratory of Olaf Pongs at the Center for Molecular Neurobiology in Hamburg where he studied beta subunits of voltage-dependent Potassium channels. After a postdoc at the University of Washington in Seattle in the laboratory of Bill Catterall, he led a junior research group in the Department of Erwin Neher at the Max Planck Institute for biophysical chemistry in Göttingen, Germany. In 2000 he became Chairman of the Institute for Physiology at the University of the Saarland Medical School in Homburg, Germany. Currently he is founder and co-director of the Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine as well as Speaker of the Collaborative Research Center CRC (SFB 894) “Ca²⁺ Signals: Molecular Mechanisms and Integrative Functions”. Since 2008 he has been a member of the German Academy of Sciences and since 2009 a member of the Council of the International Union of Physiological Sciences (IUPS).

**David R. Stevens**

Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg, Germany

Phone: +49 6841 1616405

Fax: +49 6841 1616402

Mail: david.stevens@uks.eu

David R. Stevens studied biology at Texas A&M University and then earned a Ph.D. in Pharmacology at the University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, where he studied GABAergic neurotransmission in the lateral septum. After a postdoc at the University of California at Irvine in the laboratory of Carl Cotman, he held a position of Instructor in the Psychiatry Department of Harvard Medical School. He then moved to the Heinrich Heine University of Düsseldorf, Germany in the Department of Neurophysiology in the laboratory of Helmut Haas and subsequently moved to the University of the Saarland, to work on taste cell receptors with Bernd Lindemann. Since 2001 he leads a group at the Department of Cellular Neurophysiology of the University of the Saarland.

Übersichtsartikel

Tim Czopka* und Franziska Auer

Neue Ansätze zur Analyse von Axon-Oligodendrozyten Kommunikation *in vivo*

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-0010>

Zusammenfassung: Für das Verständnis von Struktur und Funktion unseres Nervensystems ist es wichtig zu verstehen, wie sich dessen Zellen koordinieren, um ein funktionelles Organ zu bilden und aufrechtzuerhalten. Neurone und Oligodendrozyten stellen im Zentralnervensystem ein besonderes Duo dar – Oligodendrozyten myelinisieren Axone, indem sie diese eng umwickeln. Diese Interaktion reguliert Reizleitungsgeschwindigkeiten zwischen Neuronen und unterstützt axonales Überleben. Trotz dieser Bedeutung gibt es große Lücken in unserem Verständnis von Bildung, Remodellierung und Regeneration myelinisierter Axone. Zebrafische sind wegen ihrer Eignung für Lebendzellmikroskopie und genetische Manipulationen ein zunehmend populärer Modellorganismus. Hier geben wir eine Übersicht über dieses Forschungsfeld, zeigen, wie mit Zebrafischen Mechanismen der Myelinisierung erforscht wurden, und wie offene Fragen zur Kontrolle von Axon-Oligodendrozyten Interaktionen für Nervensystemfunktion in Zukunft untersucht werden können.

Schlüsselworte: Axon; *in vivo* Mikroskopie; Myelin; Oligodendrozyt; Zebrafisch

Einleitung

Unser Zentralnervensystem (ZNS) besteht aus Milliarden von Zellen, die in einem faszinierenden Zusammenspiel kontinuierlich miteinander kommunizieren und so ein funktionierendes Organ bilden. Die einzelnen Neurone

(Nervenzellen) sind dazu über zum Teil lange Fortsätze (Axone) miteinander verbunden, über welche sie kommunizieren. So fügen sie sich zu einem gigantischen Netzwerk zusammen, um Information zu verarbeiten. Es ist immer noch weitgehend unverstanden, wie sich Neurone in unserem Gehirn vernetzen. Ein dabei nicht außer Acht zu lassender Faktor ist die Geschwindigkeit und die zeitliche Feinabstimmung, mit welcher Signale zwischen Neuronen ausgetauscht werden.

Als weiße Substanz unseres Gehirns bezeichnet man die Regionen, in denen Axone Informationen zwischen den verschiedenen Hirnregionen austauschen (die graue Substanz bezeichnet die Bereiche, in denen die Zellkörper der Neurone sitzen). Diese Faserbahnregionen erscheinen weiß, da die meisten Axone mit einer fettigen Substanz umhüllt sind, dem Myelin. Myelin ist eine evolutionäre Anpassung von Wirbeltieren, welche der elektrischen Isolation von Axonen dient, und eine schnelle und energiesparende Reizweiterleitung ermöglicht. Die Entwicklung eines komplexen Nervensystems mit seiner großen Zellzahl wurde dadurch wahrscheinlich überhaupt erst möglich gemacht. Myelin wird im ZNS von speziellen Gliazellen, den Oligodendrozyten, produziert. Genetische Defekte (zum Beispiel Leukodystrophien), die den Aufbau oder Erhalt myelinisierender Oligodendrozyten stören, führen zu motorischer sowie kognitiver Fehlentwicklung. Ähnlich führen degenerative Myelinerkrankungen zu senso-motorischen Störungen, bis hin zur Lähmung, wie es bei Multipler Sklerose der Fall ist, einer Autoimmunerkrankung, in der Myelin selektiv zerstört wird. Darüber hinaus gibt es zunehmend Erkenntnisse, die darauf hinweisen, dass dynamische Myelinisierung sogar in die Regulation von Lernvorgängen involviert ist, und dass myelinisierende Gliazellen zusätzliche Rollen bei der Aufrechterhaltung von Nervensystemfunktion spielen, die abseits ihrer Rolle als elektrischer Isolator liegen.

In diesem Artikel möchten wir eine Übersicht über dieses Forschungsfeld geben und dabei den Schwerpunkt darauf legen, zu zeigen, wie man fundamentale mechanistische Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Axonen und umgebenden Oligodendrozyten mithilfe moderner

*Korrespondenzautor: Tim Czopka, Technische Universität München, Institut für Zellbiologie des Nervensystems, Munich Cluster of Systems Neurology (SyNergy), Biedersteiner St. 29, 80802 München, E-Mail: Tim.Czopka@tum.de, Web: www.neuroscience.med.tum.de; www.czopka-lab.de

Franziska Auer, Technische Universität München, Institut für Zellbiologie des Nervensystems, Biedersteiner St. 29, 80802 München, E-Mail: Franziska.Auer@tum.de

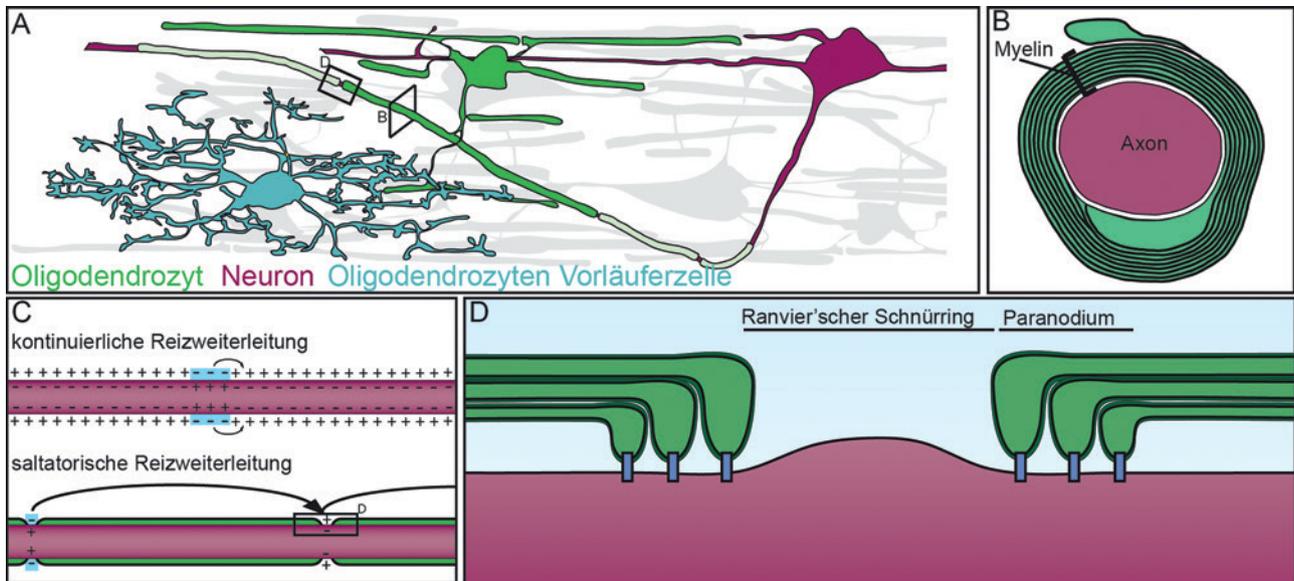


Abb. 1: Zelluläre Architektur myelinisierter Axone im Zentralnervensystem **A** Schemadarstellung eines myelinisierten Axons (magenta), eines myelinisierenden Oligodendrozyten (grün), und einer Oligodendrozyten-Vorläuferzelle (blau). **B** Schemadarstellung eines myelinisierten Axons im Querschnitt. **C** Vergleich von kontinuierlicher (oben) und saltatorischer (unten) Reizweiterleitung. Im Gegensatz zur kontinuierlichen Reizweiterleitung werden bei der saltatorischen Reizweiterleitung lediglich an den Ranvier'schen Schnürringen Aktionspotenziale generiert. **D** Schemadarstellung eines myelinisierten Axons im Längsschnitt um den Ranvier'schen Schnürring.

Methoden am Zebrafisch als Modellorganismus untersuchen kann.

Myelinisierung von Axonen – mehr als ein statischer Isolator

Architektur myelinisierter Axone

Der Begriff Myelin für die Umhüllung von Axonen geht auf den Pathologen Rudolf Virchow im Jahr 1854 zurück. Die Beschreibung von Oligodendrozyten als zelluläre Quelle von Myelin geschah aber erst 1922 durch Pio Del Rio-Hortega. Seitdem ist durch ultrastrukturelle, molekulare und physiologische Untersuchungen die Architektur myelinisierter Axone recht gut verstanden (Abb. 1). Jeder Oligodendrozyt bildet Dutzende Myelinsegmente (Internodien), von denen jedes einzelne aus einer dicht gepackten, flächigen Zellmembran besteht, die wiederholt um das Axon gewickelt ist. Die Myelinisierung des gesamten Axons erfolgt dadurch, dass verschiedene Oligodendrozyten jeweils einzelne Internodien konsekutiv entlang der Länge des Axons aneinanderreihen. Zwischen jedem einzelnen Internodium entsteht so eine nicht myelinisierte Lücke, der Ranvier'sche Schnürring, wo sich spannungs-

abhängige Na^+ -Ionenkanäle konzentrieren, die für die Reizleitung im Axon wichtig sind. So entsteht die charakteristische Struktur myelinisierter Axone (Abb. 1). Durch die dicht gepackte Myelinmembran ist das Axon von der Umgebung elektrisch isoliert. Daraus resultiert ein erhöhter Membranwiderstand, wodurch das Axon über eine längere Strecke bei geringerem Spannungsabfall depolarisiert wird. Das hat zur Folge, dass die Axonmembran mit den an Ranvier'schen Schnürringen konzentrierten Na^+ -Kanälen auch in vielfach größerer Entfernung als bei unmyelinisierten Axonen noch genügend depolarisiert wird, um ein neues Aktionspotenzial auszulösen. So scheint das Aktionspotenzial von einem Schnürring zum Nächsten zu „springen“. Myelinisierung ermöglicht Leitungsgeschwindigkeiten von bis zu 100m/s, wobei diese u. a. von der Dicke und der Länge der Myelinschichten abhängen.

Adaptive Myelinisierung zur Regulation von Nervensystemfunktion

Mathematisch ist es möglich, die optimalen Parameter für möglichst schnelle Reizweiterleitung zu bestimmen, die von der Dicke des Axons, des Myelins, und der Distanz zwischen zwei Ranvier'schen Schnürringen abhängen. In der Natur weichen Myelinisierungsmuster aber zum Teil erheblich von rechnerisch optimalen Parametern ab, um

einen zeitlich präzise koordinierten Informationsfluss zu erreichen. Ein gut studiertes Beispiel hierfür ist das auditorische System der Mongolischen Wüstenrennmaus, in dem das zeitlich präzise Ankommen von akustischen Signalen im auditorischen Hirnstamm durch die Variierung der Internodienlänge reguliert ist (Ford et al., 2015). Dieses Beispiel verdeutlicht, wie Myelinisierungsmuster für die Regulation von axonaler Funktion genutzt werden können.

Neben solchen hochspezifischen Mustern sind kürzlich komplett atypische Formen der Myelinisierung beschrieben worden. So zeigen Pyramidenneurone im Mauskortex oft nur eine partielle Myelinisierung mit langen unmyelinisierten Abschnitten (Tomassy et al., 2014). Was solche Muster für die Funktion des Axons bedeuten, ist derzeit noch völlig unklar. Es ist aber in diesem Zusammenhang interessant festzuhalten, dass variable Myelinisierung bei Mechanismen des Lernens eine Rolle spielt. So verursacht das Erlernen einer neuen motorischen Fähigkeit, wie zum Beispiel Jonglieren, beim Menschen Veränderungen in der weißen Substanz. Auch können Mäuse keine komplexen Motortests lernen, wenn die Bildung neuen Myelins genetisch blockiert wurde (McKenzie et al., 2014). Zusammen weist dies darauf hin, dass aktive Kommunikation zwischen Axon und umgebenden Oligodendrozyten ein zusätzliches regulatorisches Element höherer Nervensystemfunktion ist.

Unterstützung axonalen Überlebens

Das Ermöglichen schneller Reizweiterleitung ist nicht die einzige Aufgabe myelinisierender Zellen. Durch die enge zelluläre Interaktion des Axons mit den umgebenden Oligodendrozyten ist es nicht nur elektrisch isoliert, sondern auch von anderen umgebenden Zellen abgeschirmt, wie zum Beispiel Astrozyten, über welche Neurone mit Blutgefäßen verbunden sind. Neurone können sehr lange Axone haben, sodass der zugehörige Zellkörper (bei großen Wirbeltieren) zum Teil über einen Meter entfernt liegt. Um den hohen Energiebedarf für die Generierung von Aktionspotenzialen lokal bedienen zu können, versorgen myelinisierende Oligodendrozyten Axone mit Metaboliten aus dem Glykolysestoffwechsel (Saab et al., 2013). Damit sichern sie auch das langfristige Überleben von Axonen. In der Tat scheint es so, dass eine fehlende oder gestörte metabolische Unterstützung durch Oligodendrozyten zu axonaler Degeneration bei verschiedenen Erkrankungen beiträgt, zum Beispiel, wenn demyelinisierte Axone bei MS nicht remyelinisiert werden.

Der aktuelle Stand der Wissenschaft zeigt, wie wichtig myelinisierende Oligodendrozyten als Unterstützer und Modulatoren axonaler Funktion sind. Aber was reguliert, wenn ein Axon nach welchem Muster myelinisiert wird? Wie plastisch sind diese Vorgänge, und was sind die Ursachen für deren Deregulierung in Krankheitsprozessen? Hier gibt es noch große Wissenslücken bezüglich grundlegender Fragen, die die Kommunikation zwischen diesen zwei Zelltypen betreffen.

Da die Interaktionen zwischen Axon und Oligodendrozyt sowohl eine Zell-intrinsische, als auch -extrinsische regulatorische Komponente haben, ist es wichtig, diese unter möglichst physiologischen Bedingungen *in vivo* zu untersuchen. Myelinisierung ist entwicklungsbiologisch ein relativ spätes Ereignis, welches sich über lange Zeiträume hinziehen kann. Das macht es in vielen Tiermodellen technisch schwierig, die Dynamik zellulärer Interaktionen und deren genetische Kontrolle zu untersuchen. Zebrafische stellen einen Modellorganismus dar, mit dem man diese technischen Limitationen zum Teil überwinden kann, wie wir es in der zweiten Hälfte dieses Artikels vorstellen möchten.

Ein kleiner (Zebra-)Fisch mit großem Nutzen für die Neurowissenschaften

Zebrafische werden mittlerweile in fast allen Feldern der biomedizinischen Forschung eingesetzt. Der Grund für ihre zunehmende Beliebtheit als Modellorganismen ist zum einen, dass Zebrafische als Wirbeltiere eine Vielzahl an Genen und grundsätzlichen Funktionen mit höheren Wirbeltieren teilen, und daher viele Erkenntnisse übertragbar sind. Gleichzeitig weisen sie eine enorm schnelle Embryonalentwicklung außerhalb des Muttertieres auf. Innerhalb von nur fünf Tagen entwickelt sich aus einem befruchteten Ei ein selbständiger Organismus, der nur wenige Millimeter groß ist (Abb. 2). Darüber hinaus sind Zebrafische relativ einfach zu halten und produzieren viele Nachkommen. Deshalb wurden sie anfangs insbesondere in Mutagenese Screens eingesetzt, um Genfunktionen zu identifizieren, die phänotypischen Veränderungen zugrunde liegen.

Auch für die Neurowissenschaften stellen junge Zebrafische einen hervorragenden Modellorganismus dar. So haben sie ein relativ „simples“ Nervensystem, das aber schon in larvalen Stadien durchaus komplexe Verhaltensweisen wie die Beutejagd steuert. Das beinhaltet die Inte-

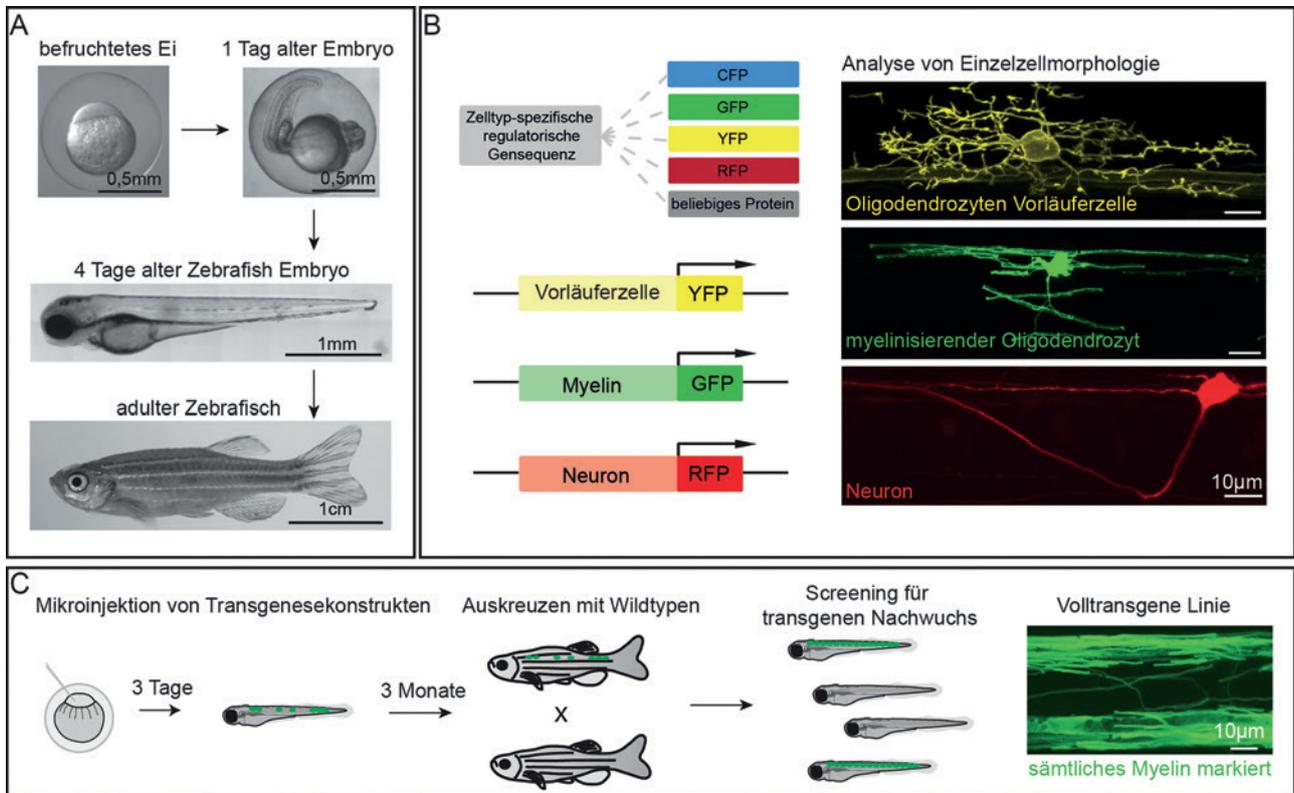


Abb. 2: Zebrafisch als *in vivo* Modellorganismus zur Untersuchung von Axon-Oligodendrozyten Interaktionen **A** Entwicklungsstadien eines Zebrafisches vom befruchteten Ei zum adulten Tier. **B** Zebrafisch-Transgenese zur Visualisierung verschiedener Zelltypen im ZNS. Zelltyp-spezifische, genregulatorische Elemente werden genutzt, um eine Vielzahl von Proteinen zu exprimieren. Durch Mikroinjektion solcher Expressionskonstrukte in befruchtete Eier können Einzelzellen von, zum Beispiel, Oligodendrozyten-Vorläufern (gelb), myelinisierenden Oligodendrozyten (grün) und Neuronen (rot) fluoreszent markiert und untersucht werden. **C** Auskreuzen injizierter Tiere mit Wildtypen führt bei Keimbahntransmission des Transgenese-Konstrukts zur einer volltransgenen Linie in der F1-Generation, in welcher dann alle Zellen eines Zelltyps markiert sind.

gration sensorischer Information sowie die Generierung eines entsprechenden Bewegungsmusters. Weiterhin sind Zebrafische leicht genetisch zu manipulieren. Befruchtete Eier können problemlos mit genetischen Konstrukten injiziert werden, um ein gewünschtes Gen zu exprimieren, oder dessen Funktion zu verändern. Aufgrund der optischen Transparenz junger Zebrafische kann ohne operativen Aufwand das gesamte ZNS beobachtet werden, sodass man neurowissenschaftliche Fragen vom Gen bis zum Verhalten am intakten Organismus untersuchen kann.

Visualisierung zellulärer Dynamik durch *in vivo* Mikroskopie von fluoreszierenden Reportern

Die geringe Größe und die optische Transparenz machen junge Zebrafische zu einem hervorragenden Modell für *in vivo* Lichtmikroskopie. Kontinuierliche technologische

Fortschritte ermöglichen, bis an die Auflösungsgrenzen klassischer Lichtmikroskopie in das Innere des Nervensystems zu blicken. Da dies problemlos in lebenden Zebrafischen geschehen kann, ist es möglich, Zellen im selben Tier zu verschiedenen Zeitpunkten abzubilden, um so Informationen über strukturelle Veränderungen zu erhalten (siehe Exkurs für eine Übersicht relevanter Mikroskopopfabauten, Abb. 3). Um Subtypen von Neuronen und Gliazellen im lebenden Zebrafisch darzustellen, werden diese häufig durch sogenannte transgene Reporter markiert. Ein typisches Transgen besteht aus einer regulatorischen Gensequenz, welche die Expression eines Reporterproteins steuert (Abb. 2). Letzteres können fluoreszierende Proteine sein, wie das grün fluoreszierende Protein GFP und dessen Varianten, die in verschiedenen Farben des sichtbaren Spektrums fluoreszieren. Es können so aber auch andere, zum Beispiel mutante Proteine exprimiert werden, um Zellfunktionen zu manipulieren. Durch Injektion von Transgenkonstrukten in Zebrafischeier können

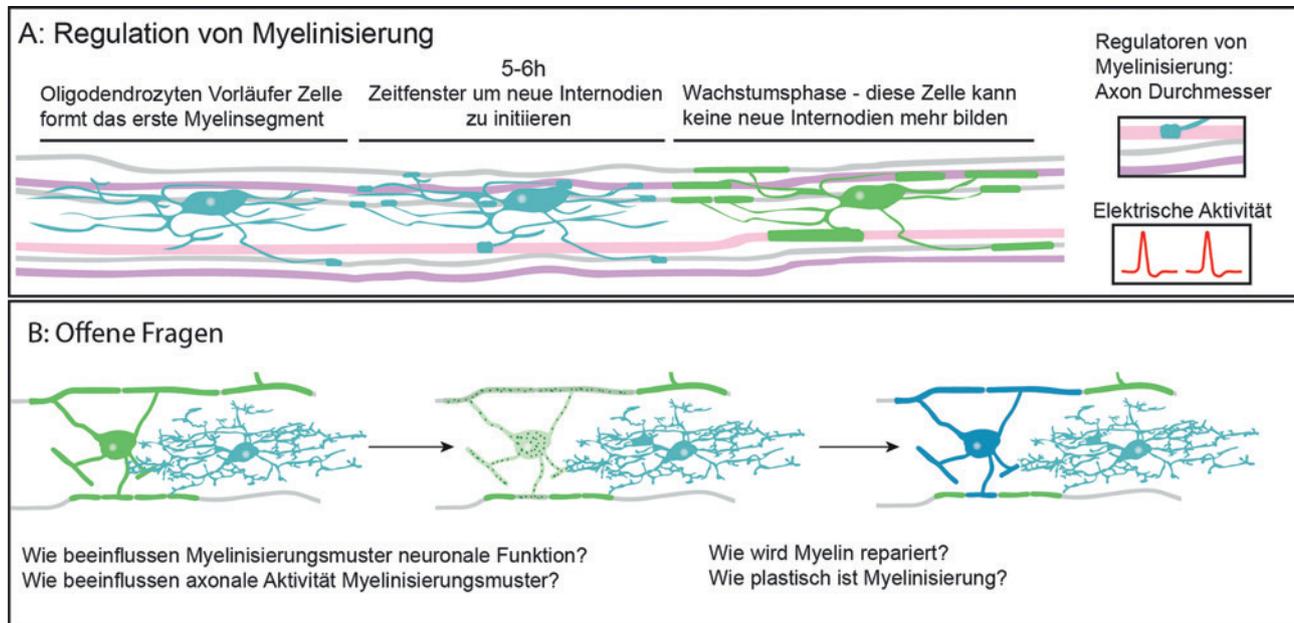


Abb. 4: Erkenntnisse und offene Fragen zur Regulierung der Bildung und Aufrechterhaltung myelinisierter Axone

so individuelle Zellen im entwickelnden Organismus mit verschiedenen Farbkombinationen dargestellt und untersucht werden. Wenn ein Transgen in Zellen der Keimbahn integriert wird, wird dieses später bei Fortpflanzung der Adulten an die Folgeneration weitergegeben, wodurch ein komplett transgener Organismus entsteht, in dem zum Beispiel alle Zellen eines Zelltyps markiert sind (Abb. 2). So wurden von uns und anderen in der Vergangenheit eine Reihe transgener Reagenzien entwickelt, um mit verschiedenen genregulatorischen Sequenzen fluoreszierende Proteine zu exprimieren, und so spezifisch Oligodendrozyten, deren Vorläuferzellen, sowie myelinisierte Axone zu visualisieren [siehe (Czopka, 2016) für eine detaillierte Übersicht publizierter Linien, die Oligodendrozytenbiologie im Zebrafisch untersuchen]. Durch *in vivo* Mikroskopie im Zebrafisch konnten wir so zum Beispiel dazu beitragen, die lange ungelöste Frage zu beantworten, wie genau Oligodendrozyten Myelin bilden. Obwohl die Struktur von Myelin seit Jahrzehnten bekannt ist, blieben die zellulären Grundlagen der Myelinmorphogenese völlig unbekannt. Im Zebrafisch konnten wir die Initiierung einzelner Internodien untersuchen und dadurch zeigen, dass jede neue Myelinschicht in der Mitte des zukünftigen Internodiums zugefügt wird, von wo aus sie anschließend lateral expandiert und das mehrschichtige Internodium bildet (Snaidero et al., 2014). Dabei handelte es sich um die ersten Demonstrationen der Myelinmorphogenese *in vivo*. Dies ist ein gutes Beispiel, um zu verdeutlichen, wie Lebendzellmikroskopie im Zebrafisch – zusammen mit ge-

netischen und ultrastrukturellen Arbeiten – helfen kann, grundsätzliche biologische Mechanismen aufzuklären.

Woher kommt neues Myelin?

ZNS-Axone können über einen langen Zeitraum der Entwicklung eines Organismus myelinisiert werden, beim Menschen in einigen Gehirnregionen bis ins vierte Lebensjahrzehnt. Gleichzeitig kann jeder einzelne Oligodendrozyt eine Vielzahl von Internodien generieren, deren genaue Zahl kann durch axonale Parameter reguliert werden. Elegante *in vivo* Mikroskopiestudien im Zebrafisch haben bereits gezeigt, dass Oligodendrozyten Vorläuferzellen ihre Zellfortsätze kontinuierlich und hochdynamisch verändern (Kirby et al., 2006). Wann aber ein einzelner Oligodendrozyt seine Zielaxone zur Myelinisierung festlegt, war lange Zeit unverstanden. So wäre es durchaus plausibel, dass einzelne Oligodendrozyten lebenslang plastisch bleiben und damit die Aktivität der Axone, die sie myelinisieren, je nach Bedarf dynamisch regulieren. Um diese Möglichkeit zu testen, haben wir hochauflösende Zeitraffer- und Langzeitaufnahmen von Oligodendrozyten im Zebrafisch gemacht. Dadurch konnten wir zeigen, dass jeder einzelne Oligodendrozyt seine maximale Zahl an generierten Myelinsegmenten in einem kurzen Zeitfenster von nur wenigen Stunden festlegt (Abb. 4) (Czopka et al., 2013). Danach verlieren myelinisierende Oligodendrozyten die Möglichkeit, neue Internodien zu formen.

Die Existenz eines kurzen Zeitfensters zur Myelinerung für jede einzelne Zelle bedeutet unter anderem, dass neues Myelin nur von neu differenzierenden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen kommen kann. Diese repräsentieren mit ca. 5 % aller Zellen (in der Maus) einen substanziellen Anteil. Welche Rolle(n) diese Zellen aber genau spielen, ist noch nicht klar. Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sind auch die zelluläre Quelle bei der Regenerierung von geschädigtem Myelin. Remyelinisierung ist einer der wenigen regenerativen Prozesse in unserem ZNS, trotzdem funktioniert sie oft schlechter als die primäre Myelinisierung. Das manifestiert sich auch in Erkrankungen wie Multipler Sklerose, wo Remyelinisierung mit zunehmender Krankheitsdauer letztendlich oft ganz ausbleibt. Wenn es die gleichen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sind, die Axone myelinisieren und remyelinisieren, warum ist Remyelinisierung dann weniger effizient? Auf diese Frage wird es wahrscheinlich keine einfache Antwort geben, insbesondere, weil Krankheitsbilder oft multifaktorielle Ursachen und Einflüsse haben. Allerdings es ist möglich, Aspekte solcher Fragen auch im Zebrafischmodell zu testen, um Verständnis grundsätzlicher zellulärer Verhaltensweisen und deren molekularer Kontrolle zu erhalten.

Ausblick

Oligodendrozyten spielen vielfältige Rollen im Nervensystem. Diese reichen von der elektrischen Isolierung und Regulation der Reizweiterleitungsgeschwindigkeit, über metabolische Unterstützung von Axonen, bis hin zur Beteiligung bei Lernen und Gedächtnisbildung. Wir beginnen erst, die Bedeutung und die Regulation dieser Funktionen genauer zu verstehen. Was genau steuert, ob ein Axon myelinisiert wird, ist immer noch unklar. Gibt es einen alleinigen Mechanismus oder existieren mehrere parallele Signalkaskaden, von denen verschiedene Kombinationen zu aktivieren ausreichend ist, um Myelinisierung zu initiieren? Gerade mit Blick auf variable Myelinisierung ist die Existenz eines kombinatorischen Codes nicht unwahrscheinlich. Darüber hinaus ist es nicht nur wichtig, zu verstehen ob, sondern auch, wie ein Axon myelinisiert wird. Welche Faktoren regulieren Myelinisierungsmuster? Wie plastisch können sich diese verändern? Und welche Auswirkungen haben diese zellulären Vorgänge auf die Funktion unseres Nervensystems?

Zebrafische eignen sich hervorragend, um Antworten zu all diesen Fragen beizutragen. Zellmarkierung mit fluoreszierenden Reportern im lebenden Organismus ermöglichen longitudinale Studien einzelner Zellen, diese

zu manipulieren, um Prinzipien zellulären Verhaltens herauszuarbeiten. Durch die fortschreitende Entwicklung von Reagenzien zur Manipulation zellulärer Physiologie, biomolekularer Sensoren, sowie immer besser werdender Lichtmikroskopie, können nicht nur zelluläre Bewegungen mit nie da gewesener Auflösung untersucht werden, sondern auch die dynamische Kommunikation innerhalb und zwischen Zellen. Solche Untersuchungen müssen nicht auf Axone und Oligodendrozyten beschränkt bleiben, sondern können genauso Astrozyten, Immunzellen, und die Vaskulatur mit einbeziehen – Forschungsbereiche, die bereits aktiv im Zebrafisch bearbeitet werden [siehe zum Beispiel folgende Übersichtsarbeiten (Gore et al., 2012; Sieger und Peri, 2013)]. Solche Arbeiten werden helfen, ein tieferes Verständnis davon zu bekommen, wie Zellen einander koordinieren, beeinflussen, und damit Struktur und Funktion unseres ZNS steuern.

Exkurs: *in vivo* Mikroskopie

Um biologische Prozesse zu verstehen, ist es wichtig, diese in ihrem natürlichen zellulären Umfeld (*in vivo*) zu beobachten. Dies liefert wertvolle Informationen über die zeitliche Dimension zellulärer Prozesse, insbesondere der Dynamik zellulärer Interaktionen. Gleichzeitig gibt es bei der Lebendzell-*in vivo*-Mikroskopie Limitationen, die den Experimentator vor diverse Hürden stellen.

- a. Tiefenunschärfe von Informationen außerhalb der Fokusebene
- b. Optische Aberrationen
- c. Toxizität von Licht

Verschiedene Mikroskopiesysteme versuchen, diese Hürden auf unterschiedliche Art zu überwinden. Wir wollen die derzeit gebräuchlichsten Prinzipien in diesem Zusammenhang vorstellen.

Um Tiefenunschärfe (a) auszublenden, stellen die dargestellten Systeme auf verschiedene Art „optische Schnitte“ durch das Gewebe her.

Konfokales Laserscanning Mikroskop (Abb. 3, links). Das Anregungslicht wird durch eine Lochblende im Strahlengang zur Probe auf einen Punkt fokussiert. Bei der Detektion des emittierten Lichts wird durch eine weitere Lochblende im Strahlengang zum Detektor lediglich das Licht aus dem Volumen der Anregungsebene durchgelassen. Der Strahlengang des emittierten Lichts ober- und unterhalb der Fokusebene wird an der Lochblende blockiert.

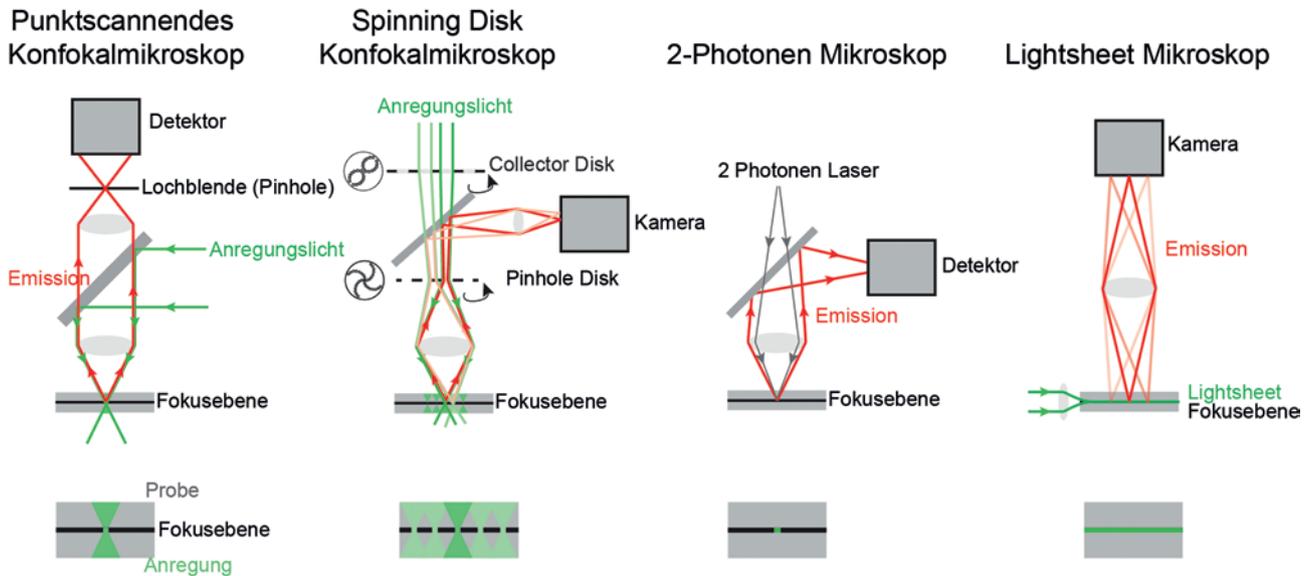


Abb. 3: Prinzipielle Aufbauten häufig genutzter Mikroskopsysteme für Lebendzellmikroskopie

Um ein mehrdimensionales Bild zu erhalten, wird die Probe in der Fokusebene in der x- und y-Achse (für 3-dimensionale Aufnahmen auch in der z-Achse) Punkt für Punkt abgescannt.

Spinning Disk Konfokalmikroskop (Abb. 3, zweites von links). Hier werden, anders als beim punktscannenden Konfokalmikroskop, viele Lochblenden auf einer Lochblendenplatte genutzt, welche über die Probe rotieren. Dadurch erfolgt die gleichzeitige Anregung und Detektion vieler Bildpunkte, die mit einer Kamera aufgenommen werden. Dies ermöglicht eine sehr schnelle Bildaufnahme.

2-Photonen Mikroskop (Abb. 3, zweites von rechts). Hier geschieht die Anregung des fluoreszierenden Moleküls ausschließlich in der Fokusebene. Die Fluoreszenzanregung erfolgt durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen einer höheren Wellenlänge, wenn diese in Summe die gleiche Energie wie bei konventioneller Anregung haben (2-Photonen-Effekt).

Lightsheet Mikroskop (Abb. 3, rechts). Bei diesem System wird durch spezielle Linsen ein dünnes Lichtblatt geformt, welches gleichzeitig die gesamte Fokusebene anregt. Die Detektion erfolgt orthogonal zur Illuminationsachse.

Optische Aberrationen (b) im Gewebe hängen direkt mit der Wellenlänge des zur Anregung und Detektion genutzten Lichts zusammen. Es gilt: Je langwelliger das Licht, desto geringer ist die Streuung, und desto tiefer dringt es in Gewebe ein. Daher ermöglicht Anregung mit Infrarotlicht bei einem 2-Photonen Mikroskop Bildaufnahmen in

erheblich tieferen Gewebeschichten als bei Anregung mit sichtbarem Licht.

Für Phototoxizität (c) gilt: Je kurzwelliger das Anregungslicht, desto energiereicher und damit toxischer. Das langwellige Licht beim 2-Photonen Mikroskop schont die Probe, aber auch kurze Anregungszeit und schnelle Detektion mit sichtbarem Licht, wie es beim *Lightsheet* und dem *Spinning Disk* Mikroskop der Fall ist, ermöglichen probenschonende Aufnahmen.

Letztlich hat auch die Wahl des Modellorganismus großen Einfluss auf die zu erreichende räumliche und zeitliche Auflösung. Junge Zebrafische sind klein und fast durchsichtig, sodass Tiefenpenetration und Aberrationen hier ein wesentlich kleineres Problem darstellen als es bei größeren Organismen der Fall ist.

Literatur

- Czopka, T. (2016). Insights into mechanisms of central nervous system myelination using zebrafish. *Glia* 64, 333–349.
- Czopka, T., French-Constant, C. and Lyons, D. A. (2013). Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Dev. Cell* 25, 599–609.
- Ford, M. C., Alexandrova, O., Cossell, L., Stange-Marten, A., Sinclair, J., Kopp-Scheinflug, C., Pecka, M., Attwell, D. and Grothe, B. (2015). Tuning of Ranvier node and internode properties in myelinated axons to adjust action potential timing. *Nat. Commun.* 6, 8073.
- Gore, A. V., Monzo, K., Cha, Y. R., Pan, W. and Weinstein, B. M. (2012). Vascular Development in the Zebrafish. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006684–a006684.

- Kirby, B. B., Takada, N., Latimer, A. J., Shin, J., Carney, T. J., Kelsh, R. N. and Appel, B. (2006). In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat. Neurosci.* 9, 1506–1511.
- McKenzie, I. A., Ohayon, D., Li, H., Paes de Faria, J., Emery, B., Tohyama, K. and Richardson, W. D. (2014). Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346, 318–322.
- Saab, A. S., Tzvetanova, I. D. and Nave, K.-A. (2013). The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 1065–1072.
- Sieger, D. and Peri, F. (2013). Animal models for studying microglia: the first, the popular, and the new. *Glia* 61, 3–9.
- Snaidero, N., Möbius, W., Czopka, T., Hekking, L. H. P., Mathisen, C., Verkleij, D., Goebbels, S., Edgar, J., Merkler, D., Lyons, D. A., et al. (2014). Myelin Membrane Wrapping of CNS Axons by PI(3,4,5)P3-Dependent Polarized Growth at the Inner Tongue. *Cell* 156, 277–290.
- Tomassy, G. S., Berger, D. R., Chen, H. H., Kasthuri, N., Hayworth, K. J., Vercelli, A., Seung, H. S., Lichtman, J. W. and Arlotta, P. (2014). Distinct Profiles of Myelin Distribution Along Single Axons of Pyramidal Neurons in the Neocortex. *Science* 344, 319–324.

Anmerkung: Übersetzung der englischen Version des Artikels online verfügbar unter <https://doi.org/10.1515/nf-2017-A010>

Autoreninformationen



Dr. Tim Czopka

Technische Universität München, Institut für Zellbiologie des Nervensystems, Munich Cluster of Systems Neurology (SyNergy), Biedersteiner St. 29, 80802 München
 Tel: +49 89 4140 3377
 Fax: +49 89 4140 3258
 E-Mail: Tim.Czopka@tum.de
 Web: www.neuroscience.med.tum.de;
www.czopka-lab.de

Tim Czopka (*1980) studierte Biologie an der Ruhr-Universität Bochum, wo er auch 2009 in Neurowissenschaften mit summa cum laude promovierte. Nach einem anschließenden fünfjährigen Auslandsaufenthalt an der University of Edinburgh (2010-2014) leitet er seit 2015 eine Emmy-Noether-Nachwuchsgruppe an der Technischen Universität München. Die Arbeit seiner Forschergruppe wird zurzeit durch das Emmy-Noether-Programm der DFG, den Munich Cluster of Systems Neurology (SyNergy) und durch einen Starting Grant des European Research Councils (ERC-StG) finanziert.



Franziska Auer

Technische Universität München, Institut für Zellbiologie des Nervensystems, Biedersteiner St. 29, 80802 München
 E-Mail: Franziska.Auer@tum.de

Franziska Auer (*1991) studierte Pharmaceutical Sciences an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München und ist seit 2015 Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Tim Czopka. Sie ist Mitglied im LMU – Graduiertenprogramm der Graduate School of Systemic Neurosciences (GSN) und Stipendiatin der Gertrud-Reemtsma Stiftung der Max-Planck-Gesellschaft.

Tim Czopka* and Franziska Auer

New Approaches to Analyse Axon-Oligodendrocyte Communication *in vivo*

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-A010>

Abstract: A major challenge for understanding our nervous system is to elucidate how its constituting cells coordinate each other to form and maintain a functional organ. The interaction between neurons and oligodendrocytes represents a unique cellular entity. Oligodendrocytes myelinate axons by tightly ensheathing them. Myelination regulates speed of signal transduction, thus communication between neurons, and supports long-term axonal health. Despite their importance, we still have large gaps in our understanding of the mechanisms underlying myelinated axon formation, remodelling and repair. Zebrafish represent an increasingly popular model organism, particularly due to their suitability for live cell imaging and genetic manipulation. Here, we provide an overview about this research area, describe how zebrafish have helped understanding mechanisms of myelination, and discuss how zebrafish may help addressing open questions related to the control of axon-oligodendrocyte interactions.

Keywords: axon; *in vivo* imaging; myelin; oligodendrocyte, zebrafish

Introduction

Our central nervous system comprises myriads of cells, which continuously communicate with each other to form a functional organ. Individual nerve cells (neurons) are connected via long process extensions (axons) to exchange information. In doing so, neurons form a gigantic and highly complex network. Here, one important aspect for precise information processing is the speed, and thus

the temporal timing, with which signals are exchanged between neurons.

The regions in which axons exchange information between different brain areas are called the ‘white matter’ (the grey matter being the areas where neuronal cell bodies reside). White matter appears white due to the presence of myelin, a fatty coating that surrounds most axons. Myelin is an evolutionary acquisition of vertebrates, which electrically insulates axons and enables rapid and energy efficient signal transmission. It is likely that these properties have in fact enabled the evolution of our complex nervous system with its high cell number. In the central nervous system (CNS), myelin is produced by specialised glial cells, the Oligodendrocytes. Genetic defects that perturb formation or maintenance of myelin (e.g. in Leukodystrophies) lead to severe motoric and cognitive symptoms. Similarly, degenerative myelin diseases lead to sensory-motor impairments and eventually paralysis, for example in Multiple Sclerosis (MS), an autoimmune disease in which myelin is selectively destroyed. Furthermore, there is increasing evidence that dynamic myelination is even involved in the regulation of brain plasticity and forms of learning, indicating that myelinating glia may play additional roles for nervous system function, beyond their role as electrical insulator.

We want to provide an overview of this area of research and emphasise how fundamental principles of the interaction between neurons and oligodendrocytes can be investigated using zebrafish as model organism.

Myelination of axons – more than static isolation

Architecture of myelinated axons

The term myelin as the ensheathment of axons dates back to 1854 by the German pathologist Rudolf Virchow. However, the identification of oligodendrocytes as the cellular source of myelin did not happen until 1922 by Pio Del Rio-Hortega. Since then, the structural, molecular and physiological properties of myelinated axons have been defined quite well (Fig. 1). Each oligodendrocyte forms

*Corresponding author: **Tim Czopka**, Technical University of Munich, Institute of Neuronal Cell Biology, Munich Cluster of Systems Neurology (SyNergy), Biedersteiner St. 29, 80802 München, Germany, Mail: Tim.Czopka@tum.de, Web: <http://www.neuroscience.med.tum.de>; <https://www.czopka-lab.de>
Franziska Auer, Technical University of Munich, Institute of Neuronal Cell Biology, Biedersteiner Str. 29, 80802 München, Germany, Mail: Franziska.Auer@tum.de

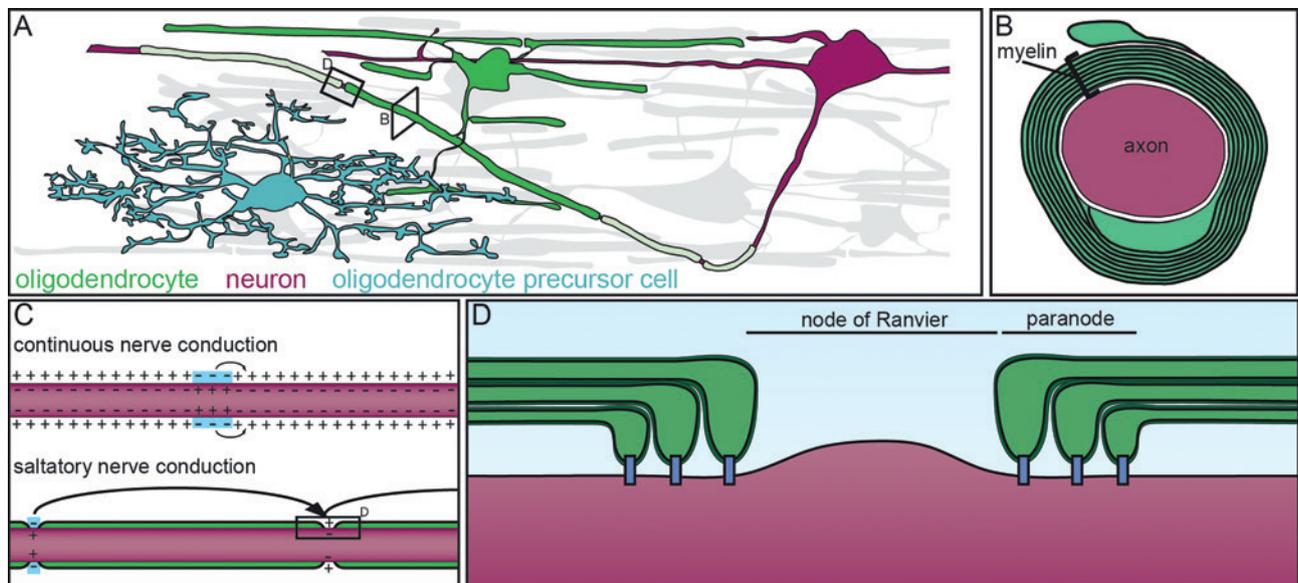


Fig. 1: Cellular architecture of myelinated axons in the CNS **A** Cartoon showing a neuron with a myelinated axon (magenta), a myelinating oligodendrocyte (green) and an oligodendrocyte precursor cell (blue). **B** Schematic cross-sectional view of a myelinated axon. **C** Comparison of continuous (top) and saltatory (bottom) nerve conduction. In saltatory conduction, action potentials are only initiated at the nodes of Ranvier, which then ‘jumps’ from node to node. **D** Cartoon showing a longitudinal section through a myelinated axon around the node of Ranvier region.

dozens of myelin segments (internodes), each of which consists of tightly packed cell membranes, that are iteratively ‘wrapped’ around the axon. The consecutive alignment of individual internodes covers the axon along its length, leaving only short unmyelinated gaps between each internode, the nodes of Ranvier, which are highly enriched in voltage gated Na^+ channels (Fig. 1). The tight stacking of myelin membrane electrically insulates the axon. This insulation increases membrane resistance, so that axon depolarisation spreads over a longer distance with a lower potential drop than along an unmyelinated axon. In consequence, the axon membrane is still sufficiently depolarised at distant nodes of Ranvier, so that resident Na^+ channels can initiate a new action potential. This way, the action potential seems to ‘jump’ from node to node. This type of saltatory conduction enables action potential propagation with up to 100m/s, whereby thickness and length of the myelin amongst other factors affect conduction speed.

Adapted and adaptive myelination to regulate nervous system function

It is possible to mathematically determine the optimal parameters for fastest action potential propagation, which are primarily affected by the thickness of the axon, the

thickness of the myelin, and the distance between the nodes of Ranvier. In nature, however, myelination patterns can greatly differ from the theoretically optimal parameters in order to precisely coordinate temporal control of information flow. For example, it has been shown that in the auditory system of the gerbil, action potential arrival times in the auditory brainstem are regulated by variation in internodal length. This enables precise control of spatial hearing (Ford et al., 2015), and very nicely exemplifies that myelination patterns can be used to regulate network function.

In addition to highly specific myelination, completely atypical patterns of myelinated axons have been described recently. For example, axons of pyramidal neurons in the adult cortex often show only discontinuous myelination with long, unmyelinated gaps (Tomassy et al., 2014). The functional repercussions of such patchy myelination are currently totally unclear. However, in this context, it is interesting to note that adaptive myelination is involved in forms of learning. Acquisition of motor skills such as juggling involves white matter changes in humans. Similarly, mice fail to learn complex motor tasks when the formation of new myelin was genetically prevented (McKenzie et al., 2014). Together, these findings are indicative that active communication between neurons and oligodendrocytes may represent an additional regulatory element of higher nervous system function.

Support of axon survival

Enabling fast action potential propagation is not the only role of myelinating glia. The tight cellular interaction between an axon and surrounding oligodendrocytes does not only provide electrical insulation, but also generally isolates the axon from surrounding cells like astrocytes, an important intermediate cell type for coupling neurons to vasculature. Neurons can have very long axons so that the corresponding cell body can be over one meter away (in large animals). In order to meet the local energy demands during action potential generation, myelinating oligodendrocytes supply axons with glycolysis metabolites (Saab et al., 2013). This ensures long-term axon survival. Indeed, it is plausible that lack of metabolic supply by oligodendrocytes contributes to axon degeneration in disease, for example when demyelinated axons do not get repaired in MS.

The current state of research shows how important oligodendrocytes are for support and modulation of axon function. However, what controls if and how an axon gets myelinated? How plastic are these processes and what are the causes of their deregulation in disease? Here, we still lack fundamental understanding of the principles that underlie communication between these two cell types.

As the interactions between axon and oligodendrocyte are likely to be under the control of cell intrinsic and extrinsic mechanisms, it is important to study them under physiological conditions *in vivo*. Myelination is a slow and long lasting process that only starts relatively late during ontogenesis. This provides technical challenges for studying dynamics of cellular interactions and their genetic control in many experimental models. Here, zebrafish represent a model organism with which one can overcome many of the technical limitations, as we will describe in the second part of this article.

A small (zebra-)fish of great value for neuroscience

Nowadays, zebrafish are used in almost all areas of biomedical research. One of the reasons for their increasing popularity is due to the fact that they share many genes and functions with those of higher vertebrates, so that many findings are easily transferable between species. In contrast to higher vertebrates, however, zebrafish develop very rapidly outside the mother. Within no more than five days, a freely swimming and independent organism of only a few millimetres develops from the fertilised egg

(Fig. 2). Furthermore, zebrafish are relatively easy to maintain and they produce high numbers of offspring, which is why they were initially used mainly in mutagenesis screens to discover gene functions that underlie specific phenotypes.

Young zebrafish represent a preeminent model organism for neuroscience research. They have a relatively ‘simple’ nervous system, which does, however, control complex behaviours such as prey capture during their early larval life. This necessitates the integration of sensory information for the generation of an according behaviour. Zebrafish are relatively easy to manipulate genetically. Fertilised eggs can be injected with genetic constructs to express any desired gene or to perturb its function. Due to the optical transparency of young zebrafish, it is possible to investigate their CNS without the need of surgical intervention. Together, this allows to address neurobiological questions from gene to behaviour in an intact organism.

Visualising cellular dynamics using *in vivo* microscopy of fluorescent reporters

The small size and optical translucency of young zebrafish make them ideally suited for *in vivo* microscopy. Continuous technological advances enable us to look into the nervous system of living animals with unprecedented resolution. This also allows to carry out longitudinal studies of the same cell in the same animal in order to obtain information about dynamics of structural changes (see excursion box for an overview of most relevant microscopy setups, Fig. 3). Subtypes of neurons and glial cells can be labelled with transgenic reporter constructs. A typical transgene consists of a gene regulatory sequence that drives the expression of a reporter protein (Fig. 2). The latter can be fluorescent proteins like the green fluorescent protein GFP and its variants, which fluoresce in different colours of the visual spectrum. However, it is equally possible to express any other protein, for example mutant proteins to manipulate cell function. Microinjection of transgenesis constructs into zebrafish eggs allows visualisation of specific cells and cell types in different colour combinations in the resulting organism. When a transgene is integrated in cells of the germline, breeding from these adults will give rise to a full transgenic animal in the daughter generation and all cells of e.g. a certain cell type are labelled (Fig. 2). This way, we and others have in the past generated a series of transgenic reagents and lines to specifically label myelin, myelinated axons, oligodendrocytes and their precursors with different fluorescent proteins (see (Czopka, 2016) for a detailed overview

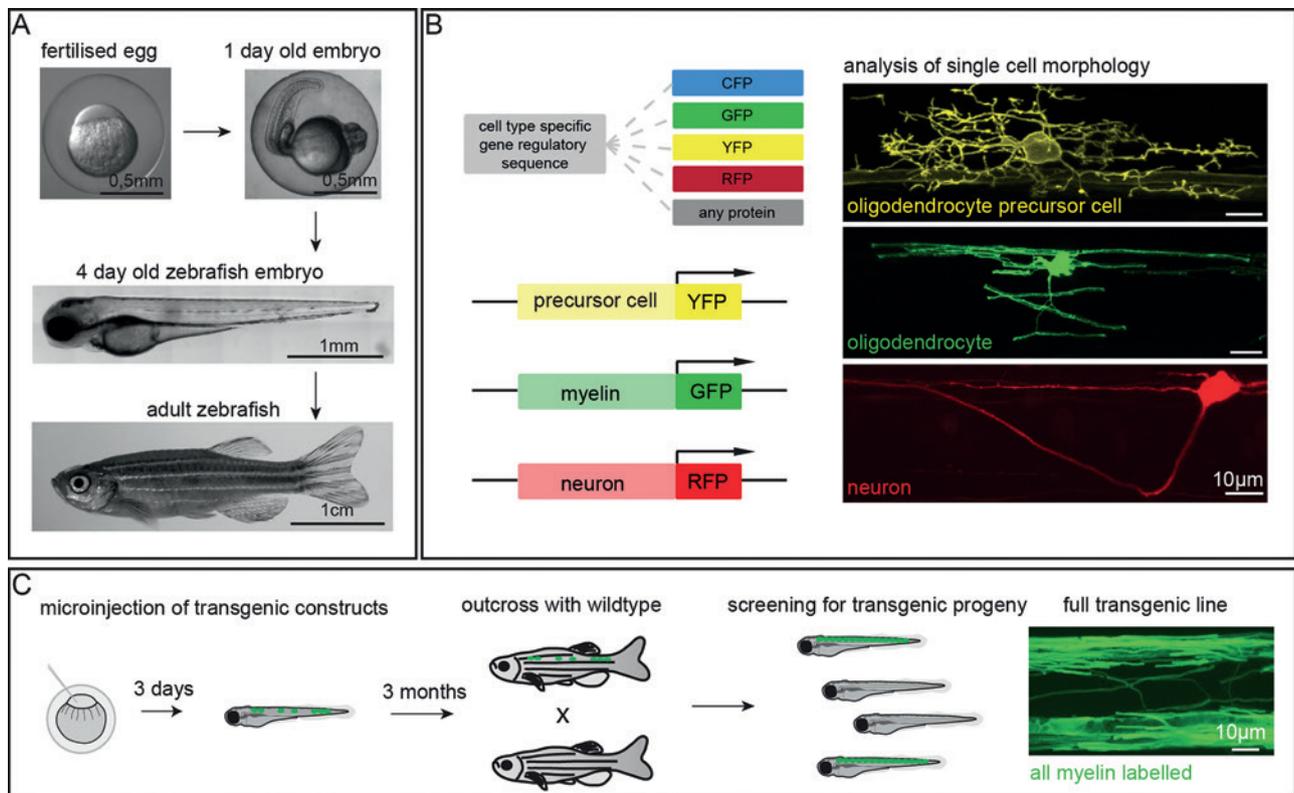


Fig. 2: Zebrafish as *in vivo* model to study axon-glia interactions **A** Major developmental stages of zebrafish from the fertilised egg to the adult animal. **B** Transgenesis in zebrafish to visualise different CNS cell types. Gene regulatory elements specific for different cell types can be used to express any protein of interest. Microinjection of such reporter constructs into fertilised eggs can be used to specifically label individual cells with fluorescent proteins, for example oligodendrocyte precursor cells (yellow), myelinating oligodendrocytes (green) and neurons (red). **C** When the transgene has been integrated into the germline of the injected animals, outcrossing of adults will lead to the generation of full transgenics in which all cells of a cell type are labelled.

of published lines used to study oligodendrocyte biology in zebrafish). Using *in vivo* live cell microscopy in zebrafish, we have been able to address the long-standing question of how oligodendrocytes form a multi-layered myelin sheath. Even though the structure of myelin is well known, the principles of myelin morphogenesis remained totally unclear. When we followed individual nascent internodes, we could show that each new layer of membrane is added at the centre of the myelin sheaths, from where it extends laterally to form the multi-layered internode (Snaidero et al., 2014). This was the first demonstration of myelin morphogenesis *in vivo*, and also provides a good example of how live cell microscopy in zebrafish – together with genetic and ultrastructural analyses – can help understand fundamental biological questions.

Where does new myelin come from?

Myelination of CNS axons is a long-lasting process. More and more axons can get myelinated over time – in some brain regions in humans up until our mid 30's. At the same time, each individual oligodendrocyte can generate many internodes (the number seems primarily determined by axonal parameters). This raises the question of where new myelin comes from during long-term development? Elegant *in vivo* imaging studies in zebrafish have revealed highly dynamic behaviour of oligodendrocyte precursor cells (Kirby et al., 2006). However, dynamics of myelinating cells, particularly when oligodendrocytes determine their internode number, remained elusive. One plausible scenario would be that oligodendrocytes can plastically regulate the myelin they produce to dynamically adjust it to axonal demands. To test this hypothesis, we have carried out high-resolution time-lapse imaging and long-term analyses of oligodendrocytes in the zebrafish. In this work, we could show that individual oligodendrocytes ini-

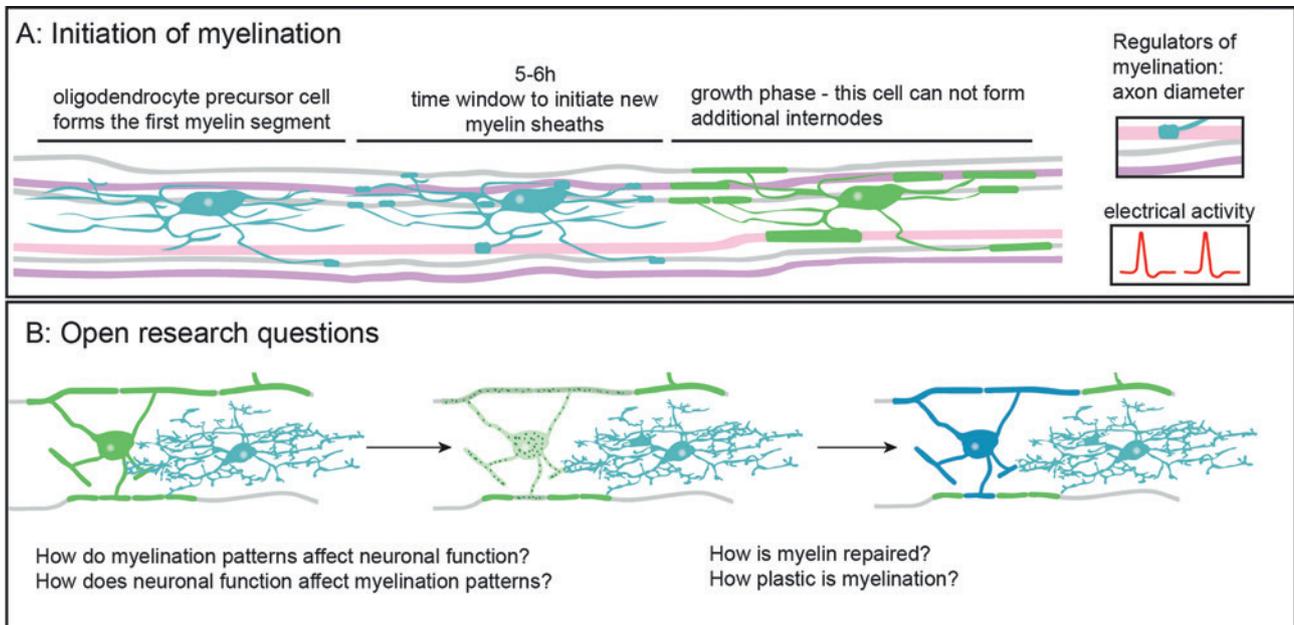


Fig. 4: Insights and open questions regarding the formation, maintenance and repair of myelinated axons

tiate all their future internodes in the very short time window of no more than six hours during their differentiation (Fig. 4) (Czopka et al., 2013). After this time, myelinating oligodendrocytes lose their capability to form new internodes.

The existence of such a short time window for each individual oligodendrocyte to form new myelin segments has important implications. It means that new internodes during long-term development can only come from newly differentiating oligodendrocyte precursor cells. These cells represent a substantial fraction of about 5% of all cells in the adult brain (in the mouse). Oligodendrocyte precursors are also the cellular source during regeneration of damaged myelin (remyelination). Remyelination is an endogenous regenerative process in the CNS, which is, however, often less efficient than primary myelination. This is also evident in diseases like MS, where remyelination often gets progressively worse and eventually fails. If the same oligodendrocyte precursor cells are responsible for primary myelination and secondary remyelination of axons, why is remyelination less efficient? There is probably no simple answer to this question, particularly because many diseases have multiple causes and influencing factors. However, it is possible to test aspects of such questions in the zebrafish model to obtain insights into fundamental principles of cellular behaviours, their intrinsic molecular control, and to disentangle the roles of surrounding cell types.

Outlook

Oligodendrocytes play diverse important roles for the function and maintenance of axons, ranging from electrical insulation, regulation of transmission speed between neurons, to the metabolic support of axons and even being involved in regulation of learning and memory. We are only beginning to understand the importance of these functions and how they are regulated. It is still not understood what controls whether an axon is myelinated or not. It is quite possible that there is no sole mechanism by which myelination in the CNS is controlled, but rather that multiple parallel cascades co-exist, and activation of different combinations may be sufficient to initiate myelination. The existence of a combinatorial code is not unlikely, especially with regard to adaptive myelination. In addition to the question whether an axon is myelinated or not, how this axon is myelinated is equally important. Which factors regulate different myelination patterns along axons? Can these plastically change? And how do these cellular changes affect nervous system function?

Zebrafish are perfectly suited to contribute answers to all of these questions. Cell labelling with fluorescent reporters in the living animal enables to carry out long-term longitudinal analyses of single cells, and to manipulate these cells to elucidate principles of cellular behaviour. The continuous development of genetic reagents to manipulate physiology, biomolecular sensors, combined with improved optical imaging methods will not only al-

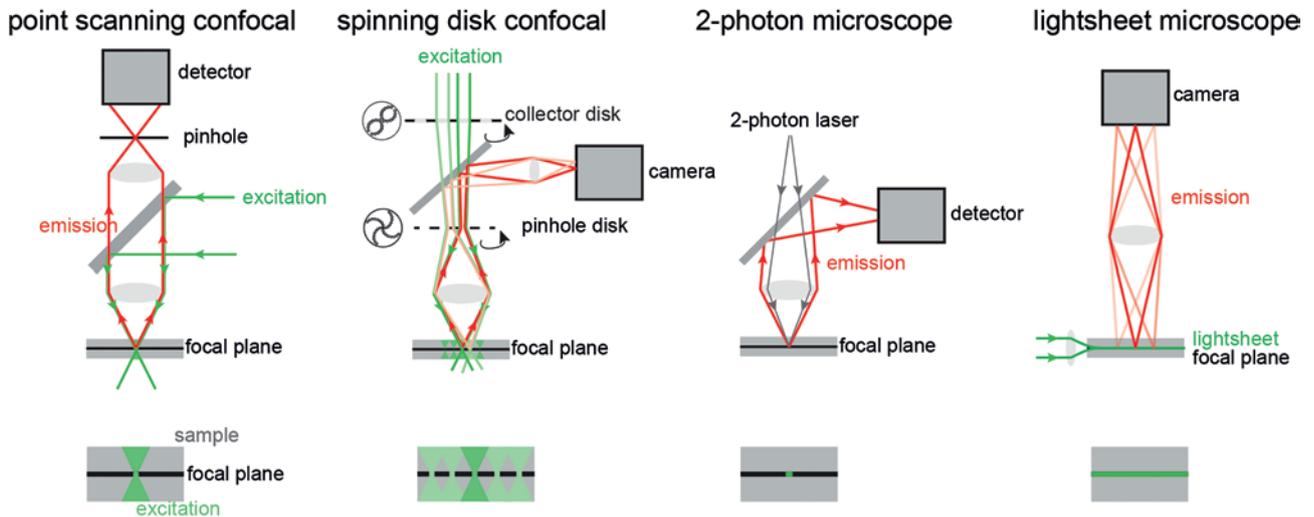


Fig. 3: Major microscopy setups used for *in vivo* live cell microscopy

low us to investigate cells with unprecedented resolution, but also to research into the dynamic communication between cells. Furthermore, such analyses do not need to be restricted to axon-oligodendrocyte interactions but can equally include astrocytes, immune cells and the vasculature – areas of active research in zebrafish (see for example the following reviews (Gore et al., 2012; Sieger and Peri, 2013). Together, this will help to obtain a deeper understanding of how cells influence one another to regulate structure and function of the nervous system.

Excursion: *in vivo* microscopy

In order to understand biological processes, it is important to investigate cells in their physiological environment (*in vivo*). This reveals important information about temporal dynamics of cellular behaviour. However, when performing *in vivo* live cell microscopy, the experimenter is confronted with various obstacles.

- Blurring by out-of-focus information
- Optical aberrations / scattering
- Toxicity of light

Different optical microscopy systems have been developed to tackle these obstacles. Here, we want to provide an overview about the most commonly used principles.

In order to get rid of out-of-focus information (a), all setups presented here generate ‘optical sections’ through the tissue.

Confocal laser scanning microscope (Fig. 3, left). The illumination light is focussed on a single point through a pinhole in the light path to the sample. During detection, only emitted light that comes from the volume of the illumination plane can pass through a second pinhole that is in the light path to a detector. Light in the path above and below the focal plane is blocked at the pinhole. To obtain a multidimensional image, the sample is scanned in the focal plane point by point in the x- and y-axis (also in the z-axis for three-dimensional images).

Spinning disk confocal microscope (Fig. 3, second from left). Different to the point scanning confocal microscope, this system uses multiple pinholes localised on a disk that rotates above the sample (spinning disk). This allows simultaneous illumination and detection of multiple points in the focal plane, which are captured by a camera.

Two-photon microscope (Fig. 3, second from right). Here, excitation only occurs in the focal plane. Excitation occurs by simultaneous absorption of two photons of a higher wavelength when they have the same summed energy as single photon excitation (two-photon effect).

Lightsheet microscope (Fig. 3, right). In this system, special lenses generate a thin lightsheet that is sent through the entire focal plane. Detection occurs orthogonally to the illumination plane.

Optical aberrations (b) in the tissue are directly related to the wavelength used for illumination and detection. Generally: the higher the wavelength, the lower the scattering and the deeper it can penetrate the tissue. For this reason, illumination with infrared light used in two-photon mi-

crosscopy enables much deeper imaging than illumination with visible light.

Regarding phototoxicity (c): the shorter the wavelength used, the more energy it has and the more toxic it is. Long wavelength illumination used in two-photon microscopy preserves the sample better than visible light. However, short illumination times as well as fast detection with visible light also reduce phototoxicity and bleaching, as it is the case in *lightsheet* and *spinning disc confocal microscopy*.

Lastly, the choice of the model organism has big impact on the spatial and temporal resolution that can be achieved. Young zebrafish are very small and thus almost translucent, so that tissue penetration and scattering are much less of an issue than with larger model organisms.

Literature

- Czopka, T. (2016). Insights into mechanisms of central nervous system myelination using zebrafish. *Glia* 64, 333–349.
- Czopka, T., French-Constant, C. and Lyons, D. A. (2013). Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Developmental Cell* 25, 599–609.
- Ford, M. C., Alexandrova, O., Cossell, L., Stange-Marten, A., Sinclair, J., Kopp-Scheinflug, C., Pecka, M., Attwell, D. and Grothe, B. (2015). Tuning of Ranvier node and internode properties in myelinated axons to adjust action potential timing. *Nat Commun* 6, 8073.
- Gore, A. V., Monzo, K., Cha, Y. R., Pan, W. and Weinstein, B. M. (2012). Vascular Development in the Zebrafish. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006684–a006684.
- Kirby, B. B., Takada, N., Latimer, A. J., Shin, J., Carney, T. J., Kelsh, R. N. and Appel, B. (2006). In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* 9, 1506–1511.
- McKenzie, I. A., Ohayon, D., Li, H., Paes de Faria, J., Emery, B., Tohyama, K. and Richardson, W. D. (2014). Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346, 318–322.
- Saab, A. S., Tzvetanova, I. D. and Nave, K.-A. (2013). The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Current Opinion in Neurobiology* 23, 1065–1072.
- Sieger, D. and Peri, F. (2013). Animal models for studying microglia: the first, the popular, and the new. *Glia* 61, 3–9.
- Snaidero, N., Möbius, W., Czopka, T., Hekking, L. H. P., Mathisen, C., Verkleij, D., Goebbels, S., Edgar, J., Merkler, D., Lyons, D. A., et al. (2014). Myelin Membrane Wrapping of CNS Axons by PI(3,4,5)P3-Dependent Polarized Growth at the Inner Tongue. *Cell* 156, 277–290.
- Tomassy, G. S., Berger, D. R., Chen, H. H., Kasthuri, N., Hayworth, K. J., Vercelli, A., Seung, H. S., Lichtman, J. W. and Arlotta, P. (2014). Distinct Profiles of Myelin Distribution Along Single Axons of Pyramidal Neurons in the Neocortex. *Science* 344, 319–324.

Article note: German version available at <https://doi.org/10.1515/nf-2017-0010>

Bionotes



Dr. Tim Czopka

Technical University of Munich, Institute of Neuronal Cell Biology, Munich Cluster of Systems Neurology (SyNergy), Biedersteiner St. 29, 80802 München, Germany
 Phone: 089-4140 3377
 Fax: 089-4140 3258
 Mail: Tim.Czopka@tum.de
 Web: <http://www.neuroscience.med.tum.de>; <https://www.czopka-lab.de>

Tim Czopka (*1980) studied biology at the Ruhr University Bochum, where he also obtained his PhD in neurosciences in 2009 (*summa cum laude*). After a postdoctoral stay at the University of Edinburgh (2010–2014), he moved to the Technical University of Munich where he is currently leading a junior research group. His work is currently funded by the Emmy-Noether programme of the DFG, the Munich Cluster of Systems Neurology (SyNergy), and an ERC Starting Grant (ERC-STG).



Franziska Auer

Technical University of Munich, Institute of Neuronal Cell Biology, Biedersteiner Str. 29, 80802 München, Germany
 Mail: Franziska.Auer@tum.de

Franziska Auer (*1991) studied Pharmaceutical Sciences at the Ludwig-Maximilian Universität (LMU) Munich, and is currently PhD student in the group of Tim Czopka. She is part of the LMU Graduate School of Systemic Neurosciences (GSN) and holds a scholarship of the Gertrud-Reemtsma Foundation of the Max Planck Society.

Übersichtsartikel

Olga Garaschuk*

Altersbedingte Veränderungen der Mikrogliazellen: ihre Rolle bei gesundem Altern des Gehirns und bei neurodegenerativen Erkrankungen

<https://doi.org/10.1515/nf-2016-0057>

Zusammenfassung: Mikrogliazellen sind die Hauptimmunzellen des Gehirns. Laut jüngster Erkenntnisse sind sie jedoch nicht nur für die Immunabwehr des Gehirns, sondern auch für viele homöostatische Funktionen von entscheidender Bedeutung. Zum Beispiel für die Entwicklung und Erhaltung neuronaler Netze, die Freisetzung von Wachstumsfaktoren zur trophischen Unterstützung umliegender Neurone, die Überwachung und Modulation der synaptischen Übertragung, die Beseitigung von extrazellulären Proteinablagerungen sowie die Reparatur von Mikroschäden des Hirnparenchyms. Folglich wirken sich altersbedingte Veränderungen der Mikroglia-Funktion auf viele Aspekte der Hirnphysiologie aus. In diesem Beitrag möchte ich die physiologischen Eigenschaften der Mikrogliazellen im erwachsenen Säugetiergehirn erörtern und die Veränderungen dieser Eigenschaften während des gesunden Alterns sowie altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen diskutieren. Anschließend sollen die diesen Veränderungen zugrunde liegenden zellulären/molekularen Mechanismen erläutert werden. All diese Daten liefern zusammen einen neuen konzeptionellen Rahmen für die Betrachtung der Rolle der Mikrogliazellen bei altersbedingter Dysfunktion des Gehirns.

Schlüsselwörter: Alzheimer-Erkrankung; Entzündung; Makrophagen; Mikroglia-Seneszenz; Neuroglia.

Einführung

Mikrogliazellen, die residenten Immunzellen des zentralen Nervensystems (ZNS), stammen von primitiven Dottersackmakrophagen ab, die vor der Bildung der Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn einwandern. Mikrogliazellen sind aus der klassischen Sicht die Immunwächter des Gehirns.

Im gesunden erwachsenen Gehirn sind die Ausläufer der Mikrogliazellen stark verzweigt, wobei jede Zelle ihr eigenes Territorium (sogenannte räumliche Domäne) bedeckt. Die Fortsätze der Mikrogliazellen verteilen sich relativ gleichmäßig in ihrem gesamten Gebiet und sind kontinuierlich in Bewegung (mit ein bis zwei Mikrometern je Minute), wobei sie die Oberfläche aller zellulären Elemente in ihrer Umgebung abtasten. Unter Normalbedingungen stehen Immunantworten von Mikrogliazellen unter strenger Kontrolle von sogenannten OFF-Signalen, die in der intakten Gehirn-Umgebung vorhanden sind (Biber et al., 2007). Die molekularen Substrate der OFF-Signale umfassen membrangebundene Immunglobuline (z. B. CD200, TREM-2, Siglecs), herkömmliche G-Protein-gekoppelte Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren (z. B. CX3CR1), Rezeptoren für Neurotransmitter, Neurotrophine und TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor- β), welche die Anwesenheit des entsprechenden Ligandes überwachen etc. Einige von ihnen stellen Rezeptor-Ligand-Paare dar, wobei von jedem Paar jeweils ein Teil selektiv auf Neuronen und der andere Teil auf Mikrogliazellen exprimiert wird. Bei anderen Paaren handelt es sich um Mikrogliazellen-ansässige Rezeptoren für Moleküle, die während physiologischer neuronaler Aktivität freigesetzt werden. Gemeinsam übermitteln die OFF-Signale die „alles-ist-gut“-Botschaft an Mikrogliazellen, indem sie eine immunsuppressive Umgebung schaffen.

Das Auftreten von entweder Pathogen- (PAMPs) oder schädigungsassoziierten molekularen Mustern (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) in deren Umge-

*Korrespondenzautor: Olga Garaschuk, Physiologisches Institut, Lehrstuhl II, Universität Tübingen, Keplerstr. 15, 72074 Tübingen, E-Mail: olga.garaschuk@uni-tuebingen.de

bung verursacht eine Aktivierung der Mikrogliazellen und löst die Immunantwort dieser Zellen aus. DAMPs umfassen auch neuronale schädigungsassoziierte ON-Signale (z. B. ATP und seine Derivate, RNA, DNA, hohe Konzentrationen an Neurotransmitter-Glutamat etc.). Darüber hinaus kann die Immunantwort von Mikrogliazellen auch durch ein Ausbleiben der OFF-Signale ausgelöst werden. Aktivierte Mikrogliazellen verändern ihre Morphologie in Richtung des hypertrophen bzw. amöboiden Phänotyps, verlieren ihre Territorialität, wandern zur geschädigten Stelle, vermehren sich, erhöhen die Expression von Oberflächenmolekülen (z. B. Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II Glykoprotein (MHC II)) und beginnen mit der Freisetzung von Immunmediatoren, wie pro- oder antiinflammatorischen Zytokinen sowie reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Darüber hinaus können sich Mikrogliazellen in hoch phagozytische Zellen verwandeln, die Zelltrümmer, pathologische Proteinaggregate oder bakterielle bzw. virale Pathogene entfernen. Analog zur Aktivierung von T-Lymphozyten waren für Mikrogliazellen bisher zwei unterschiedliche Aktivierungsphänotypen definiert. Mit M1-Phänotyp bezeichnete man potenziell neurotoxische, „klassisch aktivierte“ Mikrogliazellen, die entzündungsfördernde (proinflammatorische) Mediatoren (z. B. TNF- α , IL-1 β und IL-6, ROS, Stickstoffmonoxid usw.) freisetzen. Als M2-Phänotyp wurden dagegen „alternativ aktivierte“, neuroprotektive Mikrogliazellen bezeichnet, welche antiinflammatorische Mediatoren (z. B. IL-4 und IL-10, TGF- β) sezernieren. Neuere Daten zeigen jedoch, dass Mikrogliazellen viele verschiedene Aktivierungszustände annehmen können, indem sie klassische Merkmale von M1- und M2-Phänotypen kombinieren (Hanisch und Kettenmann, 2007).

Im Laufe der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu ihrer klassischen Rolle als die erste und wichtigste Form der aktiven Immunabwehr des Gehirns, Mikrogliazellen auch bei vielen „homöostatischen“ Prozessen, welche die Entwicklung und Aufrechterhaltung funktioneller neuronaler Netze beeinflussen, eine Schlüsselrolle spielen. Pränatal sind Mikrogliazellen für die Kontrolle der Anzahl neuronaler Vorläuferzellen in der Hirnrinde sowie für deren Verschwinden in späten Stadien der Neurogenese verantwortlich. Darüber hinaus tragen sie zur embryonalen Vernetzung des Vorderhirns bei. Während der frühen postnatalen Entwicklung beteiligen sich Mikrogliazellen sowohl an der Bildung als auch an der Eliminierung von synaptischen Kontakten und dendritischen Dornfortsätzen, während sie im intakten, reifen Gehirn das Niveau der synaptischen Aktivität messen, dynamisch mit Synapsen interagieren und zu einer fortlaufenden strukturellen Plastizität der synaptischen

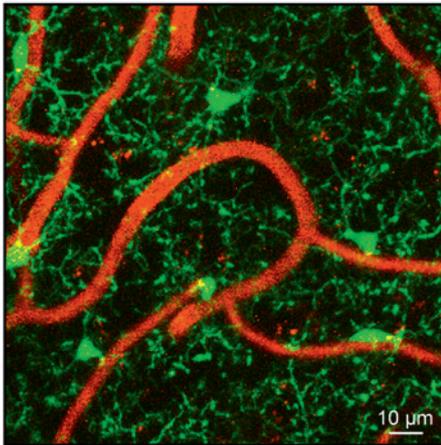
Kontakte beitragen [siehe Zusammenfassung in (Wake et al., 2013; Wu et al., 2015)]. Des Weiteren deuten jüngste Ergebnisse darauf hin, dass Mikrogliazellen die Wirksamkeit von synaptischen Verbindungen zwischen Neuronen, unter bestimmten Umständen sogar durch physikalische Trennung der prä- und postsynaptischen Elemente, beeinflussen können, und dass durch die Wechselwirkung zwischen Neuronen und Mikrogliazellen die synaptische Plastizität (d. h. die aktivitätsabhängige Modulation der synaptischen Übertragung) verändert werden kann (Wu et al., 2015).

Angesichts ihrer fundamentalen Bedeutung für die Funktionsfähigkeit des Immun- und des Nervensystems des Gehirns wird zunehmend deutlicher, dass die altersbedingte Beeinträchtigung der Physiologie der Mikrogliazellen sehr wahrscheinlich nicht nur die Immunabwehr des Gehirns, sondern auch wichtige kognitive Funktionen in Bezug auf Motivation und Wachsamkeit sowie Lernen und Gedächtnisbildung beeinflusst. In dieser Übersichtsarbeit sollen die neuesten Daten zu funktionellen Eigenschaften von Mikrogliazellen während des normalen Alterns sowie bei altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen analysiert und mögliche Konsequenzen einer altersabhängigen Dysfunktion dieser Zellen behandelt werden.

Normale Alterung der Mikrogliazellen: Reaktivität oder Seneszenz?

Wie oben bereits erwähnt, besitzen Mikrogliazellen im gesunden jungen ZNS eine typische verzweigte Morphologie. Darüber hinaus sind die räumlichen Domänen der Mikrogliazellen gleichmäßig über das gesamte Hirnparenchym verteilt und ermöglichen dadurch eine annähernd komplette räumliche Abdeckung des Hirngewebes. Mit zunehmendem Alter unterliegen Mikrogliazellen morphologischen, physiologischen und molekularen Veränderungen, die in der Gesamtheit den alternden mikroglialen Phänotyp definieren (Abb. 1). Die Länge der Mikroglia-Fortsätze reduziert sich mit fortschreitendem Alter und somit deckt eine einzelne Zelle ein geringeres Gewebvolumen ab. Darüber hinaus scheint die Anordnung und Gleichförmigkeit der mikroglialen Domäne zu verfallen, wobei einerseits große Bereiche ohne mikrogliale Fortsätze und andererseits Bereiche mit aneinanderhängenden Mikrogliazellen entstehen. Darüber hinaus weisen gealterte Mikrogliazellen ein zunehmendes Soma-Volumen, eine abnehmende Komplexität bzw. Zirkularität des Verzweigungsmusters ihrer Fortsätze (Abb. 1) und eine steigende Anzahl von Zellen in einigen, jedoch nicht in allen untersuchten Hirnre-

Erwachsen



Alt

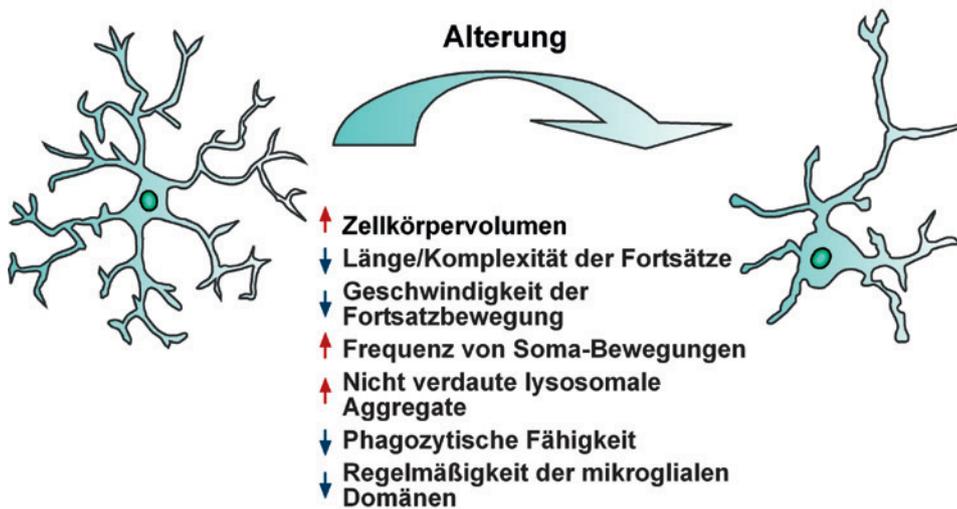
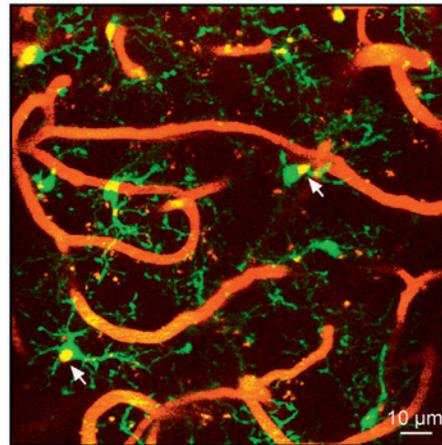


Abb. 1: Unterschiede in morphologischen und funktionellen Eigenschaften zwischen erwachsenen und alten Mikrogliazellen. Obere Reihe: Maximumintensitätsprojektionen von *in vivo* aufgenommenen Bildreihen der Schicht 2/3 des frontalen bzw. motorischen Kortex von 5 Monate alten (linkes Bild; 30–68 μm Tiefe, Schritt 1 μm) und 18 Monate alten (rechtes Bild, 9–47 μm Tiefe; Schritt 1 μm) CX3CR1⁺/GFP-Mäusen. Die Aufnahmen wurden bei ähnlichen Beleuchtungsbedingungen durchgeführt, die Blutgefäße wurden durch eine i.p. Injektion des roten Fluoreszenzfarbstoffes Sulforhodamin B markiert. Weiße Pfeile zeigen große Lipofuszingranula in Mikrogliazellen an. Untere Reihe: Eine schematische Darstellung von erwachsenen (links) und alten (rechts) Mikrogliazellen, zusammen mit einer Liste von morphologischen und funktionellen Eigenschaften, die sich im Laufe der Alterung verändern (siehe Text für weitere Einzelheiten). Farbige Pfeile zeigen die Richtung der Veränderung.

gionen bzw. Mäusestämmen auf. Diese morphologischen Veränderungen treten zusammen mit einer Abnahme der Basismotilität von mikroglialen Fortsätzen und einer langsameren gerichteten Fortsatzbewegung auf eine Läsionsstelle hin auf. In Gehirnen älterer Menschen zeigen einige Mikrogliazellen eine dystrophische Morphologie, in denen einige mikrogliale Fortsätze deramifiziert erscheinen, wobei die übrigen Fortsätze eine erhöhte Gewundenheit

und eine zytoplasmatische Fragmentierung aufweisen (Streit, 2006).

Ein weiteres typisches Merkmal von gealterten Mikrogliazellen ist die Anhäufung von großen Einschlüssen (Abb. 1), sogenannten Lipofuszingranula, die ein „Abnutzungspigment“ – das Lipofuszin – enthalten. Wie kürzlich gezeigt wurde, enthalten mikrogliale Lipofuszingranula neben großen Mengen an Lipiden, Zuckern und Metallen

auch Myelin-Fragmente. Genetische Manipulationen, die den lysosomalen Abbau oder die Langzeitstabilität des Myelins beeinträchtigten, verstärkten die Anhäufung dieser nicht abbaubaren lysosomalen Aggregate in erwachsenen, nicht gealterten Mikrogliazellen, und parallel dazu auch die Anhäufung von morphologischen und molekularen Zeichen der mikroglialen Seneszenz. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine mikrogliale Seneszenz zum Teil durch die Überlastung der Stoffabbauwege verursacht wird.

Aus molekularer Sicht geht die Alterung eines Organismus mit einer tiefgreifenden Veränderung der Expressionsmuster von Mikroglia-Genen einher (Wong, 2013). So zeigen gealterte Mikrogliazellen eine erhöhte mRNA-Expression von pro- (TNF- α , IL-1 β , IL-6) und antiinflammatorischen (IL-10, TGF- β) Zytokinen, im Einklang mit der Erkenntnis, dass eine andauernde geringgradige Aktivierung des Immunsystems ein typisches Merkmal der kognitiv normalen Gehirnalterung ist (von Bernhardt et al., 2010). Tatsächlich fand man heraus, dass die Alterung sowohl von Nagetieren als auch von Menschen mit einer verstärkten Expression von Immunsystem- bzw. entzündungsrelevanten Genen einhergeht (von Bernhardt et al., 2010). Dies ermöglichte Franceschi und seinen Kollegen einen neuen Begriff zu prägen, welcher den chronischen proinflammatorischen Zustand des gealterten Organismus als „Inflamming“ beschreibt (Franceschi et al., 2007).

Im Gehirn wird „Inflamming“ vor allem über chronisch erhöhte Expression von proinflammatorischen (TNF- α , IL-1 β und IL-18) bzw. modulatorischen (z. B. TGF- β)

Zytokinen, einer Hochregulation des Expressionsniveaus von Caspase-1 (ein für die Produktion von L-1 β und IL-18 verantwortliches Enzym), MHC II, Komplementrezeptor 3 (CD11b), sowie einer Herunterregulation von antiinflammatorischen Genen wie IL-10, IL-4 oder einen im Gehirn gebildeten Nervenwachstumsfaktor (BDNF) definiert (von Bernhardt et al., 2010; Norden and Godbout, 2013). Da das Immunsystem des Gehirns hauptsächlich aus Mikrogliazellen besteht, dachte man, dass Mikrogliazellen den oben beschriebenen proinflammatorischen Zustand des alternden Gehirns vermitteln. Eine neuere Studie, die sich speziell mit den altersabhängigen Veränderungen des Genexpressionsmusters von Mikrogliazellen mittels direkter mRNA-Sequenzierung (ohne Amplifikation oder cDNA-Synthese) beschäftigte, zeigte jedoch, dass in alternden Mikrogliazellen mehrere proinflammatorische oder neurotoxische Pfade herunter- und neuroprotektive Pfade scheinbar hochreguliert wurden. So wurden in gealterten Mikrogliazellen 24 von 37 Markern des „alternativ aktivierten“, M2-Phänotyps im Gegensatz zu 5 von 12 Markern des potenziell neurotoxischen M1-Phänotyps signifi-

kant hochreguliert. Darüber hinaus entdeckten die Autoren eine bedeutende Veränderung im Expressionsmuster von Genen, die für die Wahrnehmung der mikroglialen Umgebung wichtig sind. Gentranskripte, die mit der Erkennung endogener Liganden (z. B. Neurotransmitter) assoziiert sind, schienen herunterreguliert worden zu sein, während diejenigen, die an der Erkennung von Erregern und der Neuroprotektion beteiligt sind, sind hochreguliert worden. Bei den Genen, die an der Phagozytose beteiligt sind wie z. B. CD11b, CD14, CD68 und ICAM-Gene, gab es laut Autoren wenig Veränderungen, was vermuten ließ, dass alternde Mikrogliazellen ihre phagozytische Fähigkeit u. U. bewahren können. Die Autoren schlossen daraus, dass die Fähigkeit der Mikrogliazellen gegen infektiöse Pathogene vorzugehen beim Altern erhalten bleibt, die Zellen versuchen jedoch die Aktivierung durch endogene Reize abzuschwächen um im chronisch proinflammatorischen Milieu nicht ständig aktiviert sein zu müssen.

Es muss dennoch erwähnt werden, dass die beobachtete Herunter- bzw. Hochregulierung unterschiedlicher an der Liganden-Erkennung beteiligter Gene eine Veränderung des subtilen Gleichgewichtes zwischen den ON und OFF-Signalen verursacht. Gentranskripte, die für klassische mikrogliale OFF Moleküle wie TREM-2, DAP12, Siglecs, CD200R kodieren, nehmen mit zunehmendem Alter ab (Abb. 2), parallel zu der Abnahme der entsprechenden neuronalen Transkripte für z. B. CD200, CX3CL1 (Fraktal-kin)). Gleichzeitig wirkt sich der Alterungsprozess unterschiedlich auf die Expression von purinergen Rezeptoren (ATP z. B. ist ein klassisches ON-Signal) aus (Abb. 2). Die Anzahl der Transkripte für P2X4 steigt während die für P2X7, P2Y12 und P2Y13 Rezeptoren abnimmt.

Zusammenfassend betrachtet befinden sich Mikrogliazellen im alternden Gehirn, im Vergleich zu Zellen im jungen erwachsenen Gehirn, in einem anderen Lebensumfeld. Sie leben in einer milden proinflammatorischen Umgebung mit veränderter Verteilung von ON und OFF-Signalen. Daher ist es nicht überraschend, dass viele morphologische und biochemische Eigenschaften von alternden Mikrogliazellen einen aktivierten Phänotyp aufweisen. Während die klassische Literatur das neurotoxische Potenzial von alternden Mikrogliazellen betont, lassen einige neuere Studien vermuten, dass Mikrogliazellen versuchen, sich an die veränderten Lebensumstände anzupassen indem sie ihr neuroprotektives Potenzial hochregulieren.

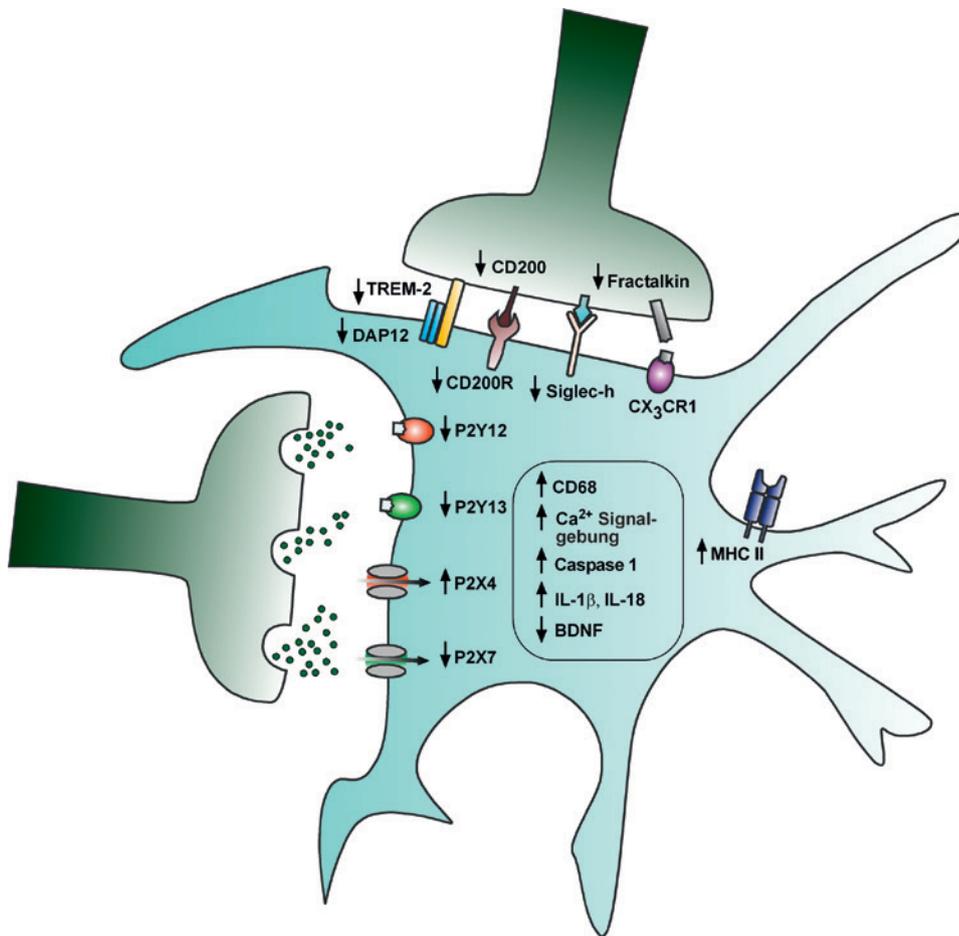


Abb. 2: Molekulare Veränderungen in den alternden Mikrogliazellen. Alterung der Mikrogliazellen geht mit Veränderungen im Expressionsmuster von OFF-Signalen (z. B. TREM-2, DAP12, CD200R/CD200, Siglec-h, CX3CR1/Fraktalkin), purinergen Rezeptoren (P2Y12, P2Y13, P2X4, P2X7), MHC II sowie mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumsignalgebung einher. Letztere verursacht die Aktivierung von kalziumempfindlichen Signalkaskaden.

Wie beeinflusst die Alterung der Mikrogliazellen ihre homöostatischen Funktionen?

Der Beitrag der Mikrogliazellen zur Aufrechterhaltung der Hirnhomöostase umfasst (i) die trophische Unterstützung der umgebenden Neurone, (ii) die Überwachung und Modulation der synaptischen Aktivität, (iii) die Phagozytose sich ansammelnder extrazellulärer Zelltrümmer und (iv) die Reparatur von Mikroschäden des Hirnparenchyms. Die trophischen Faktoren, die durch Mikrogliazellen freigesetzt werden, umfassen BDNF, der neuronales Wachstum, Differenzierung, Überleben und lernabhängige Entstehung von Synapsen fördert, sowie TNF- α , welcher die Neuroprotektion während der zerebralen Ischämie mitunterstützt. Darüber hinaus spielt der von den Mikrogliazellen stammende TNF- α bei der Kontrolle der Gluta-

matfreisetzung aus Astrozyten eine wichtige Rolle. Somit reguliert er direkt die neuronale Feuerrate sowie die durch Glutamat hervorgerufene Neurotoxizität. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Kontakte zwischen mikroglialen Fortsätzen und neuronalen Somata sowohl die spontane als auch die durch äußere Reize evozierte neuronale Aktivität verringern.

Wie bereits oben erwähnt, geht die Alterung von Mikrogliazellen mit einer Abnahme der Expression der BDNF-Gentranskripte und vermutlich auch der Freisetzung von BDNF, einer Erhöhung des TNF- α im Gehirngewebe und einer verminderten Beweglichkeit von Mikroglia-Fortsätzen einher (von Bernhardt et al., 2010; Wong, 2013), was insgesamt eine verminderte Neuroprotektion und erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration im Hirnparenchym zur Folge hat. Dies verstärkt die Aktivität von alternden Neuronen und fördert eine durch Glutamat hervorgerufene Neurotoxizität.

Die langsamere, weniger effiziente Bewegung der mikroglialen Fortsätze zu einer Läsionsstelle hin verringert die Fähigkeit von Mikrogliazellen kleine Hirnschäden, die beispielsweise durch Rupturen von winzigen Blutgefäßen oder kleinen ischämischen Ereignissen verursacht werden, zu begrenzen. Darüber hinaus sind diese Mikroschäden die wahrscheinlichste Ursache für die verstärkte „spontane“ Kalziumsignalgebung der alternden Mikrogliazellen (Brawek et al., 2014). Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration wiederum kann viele kalziumabhängige Prozesse, wie die Herstellung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und IL-18 bzw. Stickstoffmonoxid aktivieren, was zu Veränderungen in der synaptischen Übertragung und Plastizität führt.

Als spezialisierte Hirnmakrophagen, akkumulieren alternde Mikrogliazellen große Mengen an Lipofuszin-Granula (Abb. 1) sowie andere Arten von Einschlüssen. Diese scheinen nahezu vollständig mit Zellschutt gefüllt zu sein. Dieser Zustand ist wahrscheinlich eine Nebenfolge von lebenslangen phagozytischen Aktivitäten dieser Zellen (im griechischen bedeutet „Makrophage“ wörtlich „großer Esser“) und weist auf eine mögliche Erschöpfung ihrer phagozytischen Fähigkeiten hin (Streit, 2006). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Expression von TREM-2 – einem mikroglialen Rezeptor, der die Phagozytose ankurbelt – im fortgeschrittenen Alter herunterreguliert wird (Abb. 2).

Folglich deuten immer mehr Beweise darauf hin, dass mit zunehmendem Alter alle homöostatischen Funktionen von Mikrogliazellen verändert bzw. beeinträchtigt werden.

Wie beeinflusst das Altern der Mikroglia die Immunabwehr des Gehirns?

Als Hauptimmunzellen des Gehirns reagieren Mikrogliazellen auf akute Verletzungen, Infektionen oder Krankheiten mit einer biphasischen Antwort, beginnend mit einer schnellen, proinflammatorischen Aktivierungsphase gefolgt von der langsameren antiinflammatorischen und neuroprotektiven Gewebereparaturphase, die während der Entzündungsauflösung auftritt. Das richtige Timing beider Phasen ist einerseits für die effiziente Reaktion auf Verletzungen und Infektionen und andererseits für den Schutz des Hirnparenchyms vor Mikroglia-induzierten Schäden notwendig (Wong, 2013). Die sich anhäufenden Beweise deuten darauf hin, dass alternde Mikrogliazellen

übertriebene proinflammatorische Reaktionen auf sowohl periphere als auch zentrale Entzündungen generieren (Norden und Godbout, 2013; Wong, 2013). In einem alternden Organismus bewirkt beispielweise die periphere Injektion des bakteriellen Zellwandbestandteiles LPS eine langanhaltende und übertriebene Immunantwort im Gehirn, die mit einer Hochregulierung der Gentranskripte für IL-1 β , IL-6 und TNF- α gefolgt von einer Erhöhung der Konzentration entsprechender proinflammatorischer Zytokine einhergeht. Die mRNA-Expression von IL-1 β und TNF- α bleibt bis zu 72 Stunden lang nach LPS-Injektion erhöht – viel länger als im adulten Gehirn (bis zu 24 Stunden). Die lang anhaltende Entzündungsreaktion im Gehirn korrelierte gut mit der verlängerten LPS-induzierten Verhaltensstörung von alternden Versuchstieren, was eine Verringerung des Appetits und einen depressiven Rückzug aus normalen sozialen Aktivitäten zur Folge hatte (Norden und Godbout, 2013). Alternde Tiere wiesen übertriebene Immunreaktionen auch auf andere Stressfaktoren wie hämorrhagische Schlaganfälle, Verletzungen, Neurotoxine oder Traumata auf (Wong, 2013). Dieser partielle Kontrollverlust über das angeborene Immunsystem des Gehirns könnte zu einer längeren Beeinträchtigung der Gehirnfunktion, des Gedächtnisses und der Kognition und im Extremfall auch zur Neurodegeneration führen.

Mikrogliazellen und altersbedingte neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen, einschließlich Alzheimer-, Parkinson- und die Huntington-Krankheit, sind unheilbare Krankheiten, die eine fortschreitende funktionelle Beeinträchtigung, Degeneration und den Tod neuronaler Zellen zur Folge haben. Obwohl jede der neurodegenerativen Erkrankungen eine eigene Ätiologie aufweist, entstehen viele von ihnen im fortgeschrittenen Alter und gehen mit anomalen Proteinablagerungen im Gehirn (sogenannter Amyloidose) einher. Aufgrund der weltweiten Alterung der Bevölkerung (Zahl der Menschen älter als 65 Jahre wird sich voraussichtlich in den nächsten 15–20 Jahren verdoppeln, und der Anteil der ältesten Alten (85+) wird von derzeit 7% auf 12% der Bevölkerung ansteigen), stellen diese Krankheiten große Herausforderungen für die öffentlichen Gesundheitssysteme auf der ganzen Welt dar. Zum Beispiel sind von der Demenz, unter der die Alzheimer-Krankheit (AD) die vorherrschende Form ist, mehr als 25 Millionen Menschen weltweit betroffen. Die Hauptmerkmale der AD umfassen intrazelluläre Ansammlungen von hyperphosphoryliertem Mikrotubuli-assoziiertem Pro-

tein Tau, die Akkumulation von Amyloid- β -Ablagerungen im Hirnparenchym, den Verlust von Synapsen und eine progressive Beeinträchtigung der neuronalen Funktion, was schließlich zum Tod vieler Nervenzellen führt.

Neuere genomweite Assoziationsstudien haben viele Gene als AD-Risikofaktoren identifiziert, die mit den Mikrogliazellen bzw. der Immunantwort zusammenhängen. Das Risiko, das mit einer spezifischen Mutation in dem für das TREM2-Protein kodierenden Gen assoziiert ist, ist z. B. so hoch wie jenes, welches mit dem $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoprotein E assoziiert ist. Der Letztere war bekanntlich bis vor Kurzem der einzige bekannte genetische Risikofaktor für die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit. Gleichzeitig wurde jedoch berichtet, dass der Unterschied in der Expression Immunsystem-relevanter Gene im Gehirn von jungen und alten gesunden Probanden viel größer ist als der zwischen Hirnen von gesunden Probanden und AD-Patienten gleichen Alters. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die altersbedingte milde chronische Entzündung und speziell die erhöhte Reaktivität der gealterten Mikrogliazellen die Entwicklung von AD fördern könnten. Einer der möglichen Mechanismen der entzündungsvermittelten Entstehung der Alzheimer-Krankheit wurde vor Kurzem von der Beth-Stevens-Arbeitsgruppe entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass die klassischen Komplementsystem-vermittelten Mechanismen der Beseitigung von Synapsen, die in der frühen postnatalen Entwicklung überschüssige Synapsen eliminieren, durch Amyloid-Ansammlungen reaktiviert werden und eine Mikroglia-vermittelte Zerstörung der Synapsen im Laufe der Alzheimer-Krankheit verursachen.

Sowohl beim Menschen als auch bei Mausmodellen der Erkrankung weisen Mikrogliazellen, insbesondere diejenigen, die sich in unmittelbarer Nähe der Amyloid- β -Ansammlungen (sogenannte senile Plaques) befinden, eine aktivierte Morphologie [siehe beispielsweise Abb. 1 in (Brawek et al., 2014)] und eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Marker wie MHC II und CD68 auf. Darüber hinaus zeigen Plaque-assoziierte Mikrogliazellen eine dramatische funktionelle Beeinträchtigung: (i) mehr als 80% der Zellen sind „hyperaktiv“ in Bezug auf ihre spontane Kalzium-Signalgebung (Brawek et al., 2014); (ii) die Zellen zeigen eine verminderte phagozytotische Aktivität und (iii) beeinträchtigte Reaktionen auf Zell- bzw. Gewebeschäden in ihrer Nachbarschaft, wodurch das umgebende Gewebe nicht ausreichend geschützt wird. Zu beachten ist, dass TREM2 und CD33, die kürzlich als AD-Risiko-Gene identifiziert wurden, an der mikroglialen Phagozytose beteiligt sind. Während die letztgenannten Befunde auf eine Amyloid-induzierte Seneszenz der Mikrogliazellen hindeuten, weist eine übertriebene Kalzium-

Signalgebung auf die erhöhte Reaktivität der Plaque-assoziierten Mikrogliazellen hin. Wie bereits oben im Kontext des normalen Alterns der Mikroglia erwähnt, kann die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration die Herstellung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und IL-18 über den Caspase-1-vermittelten Weg hervorrufen. Ebenso bewirkt sie die Freisetzung von Stickstoffmonoxid sowie die Aktivierung der kalziumabhängigen Proteinphosphatase Calcineurin, welche die Zytokin-Expression durch Aktivierung des NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) hochreguliert (Sama und Norris, 2013). Interessanterweise benötigt ein NLRP3-Inflammasom, ein Caspase 1 aktivierender Multiprotein-Komplex, erhöhte intrazelluläre Kalziumpegel auch für die eigene Aktivierung. Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist bei Menschen sowie Mäusen mit AD besonders hoch. Darüber hinaus reduziert die Deletion des NLRP3-Inflammasom codierenden Genes die Plaque-Belastung bei AD-Mäusen und schützt sie vor dem Verlust des räumlichen Gedächtnisses.

Obwohl die Tatsache, dass die Amyloid-Ablagerungen innerhalb des AD-Gehirns die Aktivierung von Gliazellen hervorrufen, seit der Pionierarbeit von Alois Alzheimer bekannt ist, wurden die aktivierten Mikrogliazellen bis vor Kurzem als eine Spätfolge der Amyloidose betrachtet, als eine Nebenerscheinung, welche die fortlaufende Pathologie entweder ein wenig verstärkt, oder es nicht schafft, mit ihr fertig zu werden. Erst vor Kurzem wurde klar, dass die altersbedingte Dysfunktion der Mikrogliazellen für die altersabhängige Akkumulation von Amyloiden in erster Linie entscheidend sein kann (Abb. 3).

Die anhaltende geringgradige Entzündung innerhalb des alternden Gehirns und die dadurch bedingte Dysfunktion der Mikroglia führen zur verminderten Beweglichkeit der mikroglialen Fortsätze sowie zur Beeinträchtigung der Phagozytosefähigkeit durch Sättigung der Substanzabbaumechanismen. Unter diesen Bedingungen können natürlich vorkommende Amyloide von Mikrogliazellen nicht effizient entdeckt und eliminiert werden, weswegen sie sich im Hirnparenchym ansammeln und dadurch wiederum eine verstärkte Dysfunktion von Mikrogliazellen verursachen. Diese Amyloid-induzierte Dysfunktion beschleunigt die Alterung von Mikrogliazellen, löst eine Komplementsystem-abhängige Synapseneliminierung hervor und verstärkt die Beeinträchtigung der intrazellulären Kalzium-Homöostase in Mikrogliazellen. Letzteres steigert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. TNF- α und IL- β) über verschiedene kalziumabhängige Wege (z. B. Aktivierung von Caspase-1, Calcineurin oder NF κ B). Die proinflammatorischen Zytokine verstärken einerseits Entzündung im alternden Gehirn

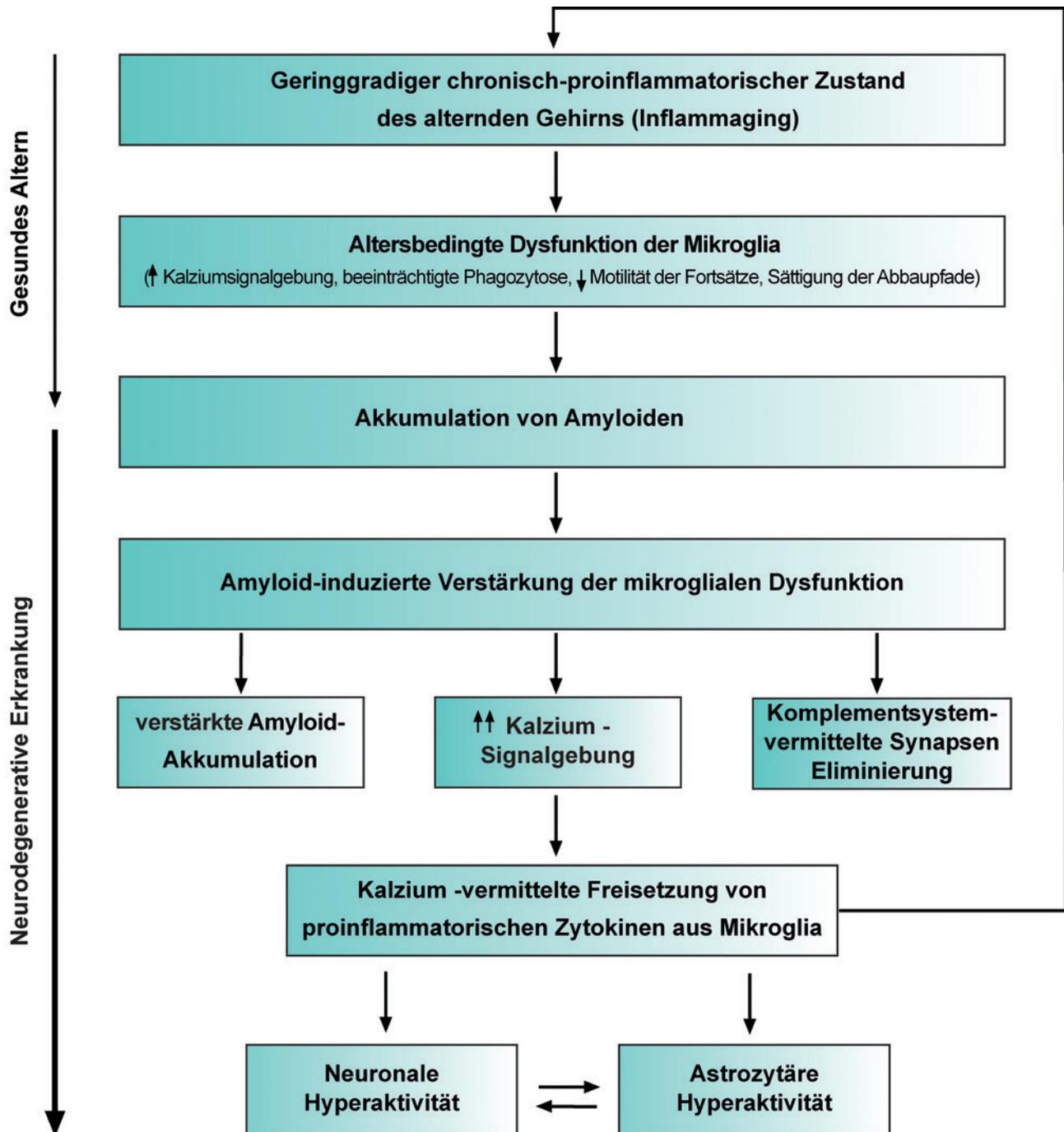


Abb. 3: Flussdiagramm der entzündungsbasierten Hypothese der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen (Einzelheiten im Text).

und schließen so den Teufelskreis der entzündungsbedingten Hirnalterung. Andererseits verursachen sie die Hyperaktivität der Kalziumsignalgebung in Neuronen und Astrozyten (Brawek und Garaschuk, 2014), was die Amyloid-induzierte Dysfunktion neuronaler Netze verschlimmert (Abb. 3). Obwohl diese Hypothese noch einen strengen experimentellen Nachweis erfordert, stellt

ihre Plausibilität Mikrogliazellen und die geringgradige andauernde Entzündung des alternden Gehirns ins Zentrum von AD-fördernden pathologischen Ereignissen und ermöglicht es, die Alzheimer-Krankheit, aber vielleicht auch andere neurodegenerative Erkrankungen, als direkte Folge der altersbedingten Dysfunktion des Immunsystems des Gehirns zu betrachten.

Danksagung: Ich danke K. Riester und M. Olmedillas del Moral für die Bereitstellung von Daten für Abb. 1, A. Kaupp für die grafische Unterstützung sowie B. Brawek und B. Kovalchuk für ihre Kommentare zum Manuskript. Diese Arbeit wurde von der Alzheimer Forschung Initiative e. V. (Nr. 14812) und der VolkswagenStiftung (Nr. 90233) unterstützt. Ich entschuldige mich bei allen Kollegen, deren Publikationen auf Grund des begrenzten Literaturumfanges dieses Übersichtsartikels nicht explizit berücksichtigt werden konnten.

Glossar

- TREM-2** (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), ein Immunglobulin, das Entzündungsreaktionen in Makrophagen hemmt. Im Gehirn wird TREM-2 ausschließlich von Mikrogliazellen exprimiert.
- DAP12** (*DNAX-activating protein 12 kDa*), ein von TREM-2 verwendetes Adaptermolekül zur intrazellulären Signalübertragung.
- Siglecs** (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*), an Sialinsäure bindende Immunglobuline. Unter physiologischen Bedingungen scheint die Erkennung von Sialinsäuren auf der neuronalen Glykokalyx die zelluläre Integrität zu signalisieren und damit die Aktivierung von Mikrogliazellen zu hemmen.
- CX3CL1** (CX3C-Ligand, Fraktalkin), ein Zytokin, das an der Adhäsion und Migration von Leukozyten beteiligt ist.
- CX3CR1** (CX3C-Chemokin-Rezeptor 1), Rezeptor für das Chemokin Fraktalkin.
- MHC II** (Haupthistokompatibilitätskomplex II), ein Oberflächenprotein, das normalerweise nur auf Antigen-präsentierenden Zellen zu finden ist.
- ROS** (reaktive Sauerstoffspezies), reaktive chemische Spezies, die Sauerstoff enthalten. Unter physiologischen Bedingungen sind ROS an der Zell-Signalgebung und der Homöostase beteiligt, in hohen Konzentrationen verursachen sie Zellschäden durch oxidativen Stress.
- BDNF** (*brain-derived neurotrophic factor*), ein Wachstumsfaktor, der für die neuronale Differenzierung und für das Überleben der Nervenzellen wichtig ist.
- NFκB** (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der an zellulären Reaktionen auf Stress, Zytokine, freie Radikale, Schwermetalle, Ultraviolett-Bestrahlung und bakterielle oder virale Pathogene beteiligt ist.
- TNF-α** (Tumornekrosefaktor α) eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine, die durch aktivierte Makrophagen produziert werden.
- TGF-β** (transformierender Wachstumsfaktor β) ein immunsuppressives Zytokin, das von vielen Zelltypen einschließlich Makrophagen sezerniert wird.
- IL-1β** (Interleukin-1β), eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine. IL-1β ist an vielen Vorgängen, einschließlich der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, entzündlicher Schmerzüberempfindlichkeit etc. beteiligt.
- IL-6** (Interleukin 6), ein proinflammatorisches Zytokin, das durch Makrophagen und T-Zellen sezerniert wird. IL-6 ist ein wichtiger Auslöser der Körpertemperaturerhöhung (Fieber) und der Akute-Phase-Reaktion.
- IL-4** (Interleukin 4), ein entzündungshemmendes Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der Wundreparatur spielt.
- IL-10** (Interleukin 10), ein entzündungshemmendes Zytokin, das LPS-vermittelte Induktion von proinflammatorischen Zytokinen hemmt.
- CD11b** (*cluster of differentiation molecule 11b*), ein von vielen Leukozyten einschließlich Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen exprimiertes Oberflächenmolekül. Unter entzündlichen Bedingungen reguliert es die Chemotaxis, die Leukozytenadhäsion, die zellvermittelte Zytotoxizität sowie die Phagozytose.
- CD14** (*cluster of differentiation molecule 14*), ein Oberflächenmolekül, das hauptsächlich in Makrophagen exprimiert wird und als Co-Rezeptor für die Erkennung von LPS dient.
- CD68** (*cluster of differentiation molecule 68*), ein Glykoprotein, das in lysosomalen und Oberflächenmembranen myeloider Zellen vorkommt. CD68 ist ein Marker für die Phagozytose-Fähigkeit der Zelle.
- CD33** oder **Siglec-3** (*sialic acid binding Ig-like lectin 3*), ein Sialinsäure-Rezeptor, der auf myeloiden Zellen exprimiert wird.
- ICAMs** (*intercellular adhesion molecules*), Immunglobuline, die kontinuierlich in niedrigen Konzentrationen in den Membranen von Leukozyten vorliegen.
- CD200** (*cluster of differentiation molecule 200*), ein Immunglobulin, das die Aktivität myeloider Zellen hemmt.
- CD200R**, Rezeptor für CD200. Im ZNS exprimieren Mikrogliazellen CD200R, während CD200 auf der Membran von Neuronen und Astrozyten exprimiert wird. Zusammen hemmt dieses Ligand-Rezeptor-Paar Entzündungsreaktionen der Mikrogliazellen.
- LPS** (Lipopolysaccharide), ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand von Gram-negativen Bakterien, der eine angeborene Immunantwort hervorruft.
- ApoE** (Apolipoprotein E), eine Klasse von Apolipoproteinen. Fasst Proteine zusammen, die Lipoproteine, fettlösliche Vitamine und Cholesterin transportieren.

Literatur

- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K. and Boddeke, H.W. (2007). Neuronal ‚On‘ and ‚Off‘ signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30, 596–602.
- Brawek, B. and Garaschuk, O. (2014). Network-wide dysregulation of calcium homeostasis in Alzheimer’s disease. *Cell Tissue Res.* 427–438.
- Brawek, B., Schwendele, B., Riester, K., Kohsaka, S., Lerdkrai, C., Liang, Y. and Garaschuk, O. (2014). Impairment of in vivo calcium signaling in amyloid plaque-associated microglia. *Acta Neuropathol.* 127, 495–505.
- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M.P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G.C. and Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and

longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing. Dev.* 128, 92–105.

Hanisch, U.K. and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10,1387–1394.

Norden, D.M. and Godbout, J.P. (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39,19–34.

Sama, D.M. and Norris, C.M. (2013). Calcium dysregulation and neuroinflammation: discrete and integrated mechanisms for age-related synaptic dysfunction. *Ageing Res. Rev.* 12, 982–995.

Streit, W.J. (2006). Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci.* 29, 506–510.

von Bernhardi, R., Tichauer, J.E. and Eugenin, J. (2010). Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J. Neurochem.* 112, 1099–1114.

Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A. and Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci.* 36, 209–217.

Wong, W.T. (2013). Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 22.

Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B.A. and Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.* 36, 605–613.

Anmerkung: Übersetzung der englischen Version des Artikels online verfügbar unter <https://doi.org/10.1515/nf-2016-A057>

Autoreninformationen



Prof. Dr. Olga Garaschuk

Physiologisches Institut, Lehrstuhl II,
Universität Tübingen, Keplerstr. 15,
72074 Tübingen

Tel: +49 7071 2973640

Fax: +49 7071 295395

E-Mail: olga.garaschuk@uni-tuebingen.de

Prof. Dr. Olga Garaschuk (geb. 1966 in Kyiv, Ukraine) studierte physiko-chemische Biologie am Moskauer Institut für Physik und Technologie (1983–1989; Diplom mit Auszeichnung) und promovierte 1992 am Bogomoletz Institut für Physiologie (Kyiv). Zwischen 1992 und 1997 arbeitete sie als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Bogomoletz Institut für Physiologie (Kyiv), am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Göttingen) und am Institut für Physiologie der Universität des Saarlandes. 2003 habilitierte sie für das Fachgebiet Physiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität (München). 2006 folgte die Berufung zur Universitätsprofessorin für Neuronale Bildgebung (W2) am Institut für Neurowissenschaften der Technischen Universität München und seit 2008 ist sie die Inhaberin des II. Lehrstuhls für Physiologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen. Die Forschungsprojekte von Prof. Garaschuk beschäftigen sich mit der Funktionsanalyse neuronaler Netzwerke in vivo, besonders in Bezug auf die adulte Neurogenese, Interaktion zwischen dem Nerven- und dem Immunsystem des Gehirns sowie die Alterung und Neurodegeneration.

Olga Garaschuk*

Age-related changes in microglial physiology: the role for healthy brain ageing and neurodegenerative disorders

<https://doi.org/10.1515/nf-2016-A057>

Abstract: Microglia are the main immune cells of the brain contributing, however, not only to brain's immune defense but also to many basic housekeeping functions such as development and maintenance of functional neural networks, provision of trophic support for surrounding neurons, monitoring and modulating the levels of synaptic activity, cleaning of accumulating extracellular debris and repairing microdamages of the brain parenchyma. As a consequence, age-related alterations in microglial function likely have a manifold impact on brain's physiology. In this review, I discuss the recent data about physiological properties of microglia in the adult mammalian brain; changes observed in the brain innate immune system during healthy aging and the probable biological mechanisms responsible for them as well as changes occurring in humans and mice during age-related neurodegenerative disorders along with underlying cellular/molecular mechanisms. Together these data provide a new conceptual framework for thinking about the role of microglia in the context of age-mediated brain dysfunction.

Keywords: Alzheimer's disease; inflammaging; macrophage; microglial senescence; neuroglia.

Introduction

Microglia, the resident innate immune cells of the central nervous system (CNS), are derived from primitive yolk sac macrophages, which colonize the brain before the blood-brain-barrier is formed (Ginhoux et al., 2010; Zhao et al., 2015). Microglial cells were classically seen as immune sentinels within the brain. In the healthy adult brain these cells are highly ramified with each cell covering its own territory (so called spatial domain). The processes of

microglia are spread relatively uniformly throughout this territory and move continuously, thereby sampling the surface of all the surrounding cellular elements (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Under healthy conditions immune responses of microglia are under the tight control of so-called OFF signals, which are constitutively present in the intact brain microenvironment (Biber et al., 2007). The molecular substrates of the OFF signals comprise membrane-bound immunoglobulins (e. g. CD200, TREM-2, Siglecs), conventional G-protein-coupled seven-transmembrane receptors (e. g. CX3CR1), receptors for neurotransmitters, neurotrophins, and TGF- β (transforming growth factor- β) interacting with the respective ligand, etc. Some of them represent receptor-ligand pairs with one of the two being selectively expressed on neurons and the other on microglia, whereas the others are microglia-located receptors for molecules released during physiological neuronal activity. Collectively OFF signals convey the “everything is good” message to microglia by creating an immunosuppressive environment.

The appearance of either pathogen- (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs) in microglial microenvironment causes activation of microglia and triggers microglia's immune response. DAMPs also comprise neuronal damage-associated ON signals (e. g. ATP and its derivatives, RNA, DNA, high concentrations of neurotransmitter glutamate, etc.). In addition, microglia's immune response can also be triggered by disruption of the OFF signaling. Activated microglia change their morphology towards an hypertrophic or amoeboid phenotype, lose their territoriality, proliferate, migrate to the site of injury, upregulate the expression of surface molecules (e. g. major histocompatibility complex type II glycoprotein (MHCII)) and start releasing immune mediators such as pro- or anti-inflammatory cytokines as well as reactive oxygen species (ROS). Moreover, microglial cells may transform into highly phagocytic cells removing cell debris, pathological protein aggregates or bacterial/viral pathogens. In analogy to activation of T lymphocytes, microglia were proposed to adopt two different activation phenotypes with M1 phenotype referring to potentially neurotoxic, “classically activated” microglia releasing pro-inflammatory mediators

*Corresponding author: Olga Garaschuk, Institute of Physiology II, University of Tübingen Keplerstr. 15, 72074 Tübingen, Germany, Mail: olga.garaschuk@uni-tuebingen.de

(e. g. tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6), ROS, nitric oxide, etc.) and M2 phenotype referring to “alternatively activated”, neuroprotective microglia releasing anti-inflammatory mediators (e. g. interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10), TGF- β). However, many recent experiments have refuted this hypothesis by showing that microglia can adopt many different activation states combining classical features of M1 as well as M2 phenotypes (Hanisch and Kettenmann, 2007).

In addition to their classical role as the first and main form of brain’s active immune defense, microglia were recently shown to play a key role in many “homeostatic” processes impacting the development and maintenance of functional neural networks. Prenatally, microglia are responsible for controlling the number of neural precursor cells in the cerebral cortex as well as their disappearance during late stages of neurogenesis (Cunningham et al., 2013) and contribute to the embryonic wiring of the forebrain (Squarzoni et al., 2014). During early postnatal development microglia are involved both in formation (Miyamoto et al., 2016) and elimination (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012) of synaptic contacts and dendritic spines, whereas in the intact mature brain microglia monitor the level of synaptic activity, dynamically interact with synapses and contribute to ongoing structural plasticity of synaptic contacts (for a review see (Wake et al., 2013; Wu et al., 2015)). Moreover, recent data suggest that microglia can influence the efficacy of synaptic connections between neurons, under some circumstances even via physical separation of the pre- and postsynaptic elements, and that interaction between neurons and microglia modify synaptic plasticity (i.e. activity-dependent modulation of synaptic strength) (Parkhurst et al., 2013; Chen et al., 2014; Wu et al., 2015).

Given the fundamental role of microglia within the framework of both immune and neural systems, it is becoming increasingly clear that age-related impairment of microglial physiology is very likely to impact not only brain’s immune defense but also its key cognitive functions related to motivation, vigilance as well as learning and memory formation. This review aims to summarize recent findings about functional properties of microglia during normal aging as well as in conditions of age-related neurodegenerative diseases and to discuss potential consequences of age-dependent microglial dysfunction.

Normal aging of microglia: reactivity or senescence?

As already outlined above, in the healthy young CNS microglia have a typical ramified morphology and microglia’s spatial domains are evenly distributed throughout the entire brain parenchyma, thus providing efficient spatial coverage of the brain tissue. With aging, microglial cells undergo morphological, physiological, and molecular changes defining the senescent microglial phenotype (Fig. 1).

The length of microglial processes, for example, is reduced with ageing, resulting in a smaller tissue volume covered by a single cell (Baron et al., 2014; Hefendehl et al., 2014). Moreover, the order and regularity of microglial domains seems to deteriorate, with large areas devoid of microglial processes on the one hand side and cells sticking to each other on the other (Tremblay et al., 2012; Askew et al., 2017). In addition, aged microglial cells show an increase in soma volume, a decrease in the complexity/circularity of the branching pattern of their processes (Fig. 1) and an increase in cell number in some but not all brain regions/mouse strains tested (Sierra et al., 2007; Tremblay et al., 2012; Baron et al., 2014; Hefendehl et al., 2014). These morphological changes are accompanied by a decrease in the baseline motility of microglial processes and a slower directed process movement towards a lesion site (Hefendehl et al., 2014). In aged human brains, some microglial cells exhibit dystrophic morphologies in which dendritic arbors appear deramified, with residual processes showing increased tortuosity and cytoplasmic fragmentation (Streit et al., 2004).

Another typical feature of the aged microglia is the accumulation of large inclusions (Fig. 1), so called lipofuscin granules, containing “wear-and-tear” pigment lipofuscin (Sierra et al., 2007; Eichhoff et al., 2008). Aside from a large lipid content, sugars and metals, microglial lipofuscin granules were recently shown to contain myelin fragments (Safaiyan et al., 2016). Moreover, genetic manipulations interfering with lysosomal degradation or long-term stability of myelin potentiated the accumulation of these undegradable lysosomal aggregates in adult, not aged, microglia, paralleled by accumulation of morphological and molecular signs of microglial senescence. These and other (Tremblay et al., 2012) data suggest that microglial senescence is largely caused by saturation of its degradative pathways.

From the molecular point of view, aging has been associated with a profound change in the expression pattern of microglial genes (Wong, 2013). Thus, aged microglia

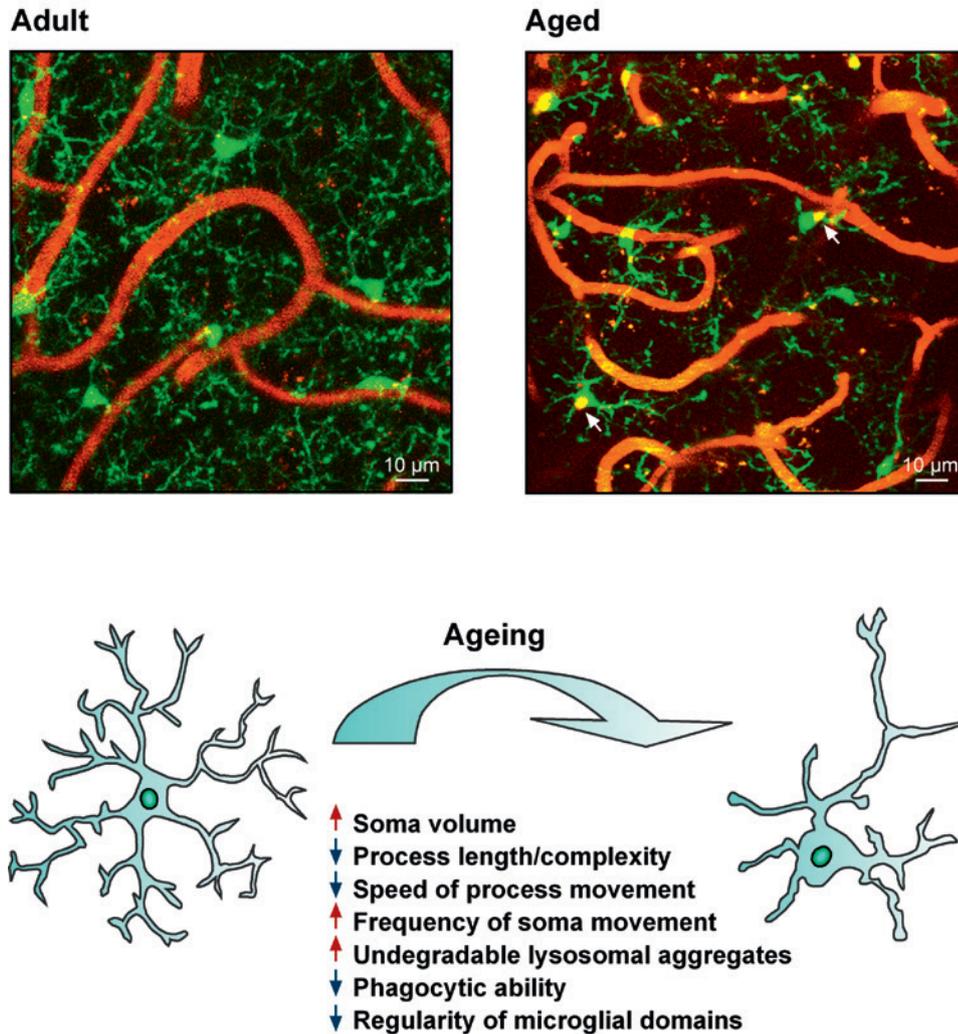


Fig. 1: Differences in morphological and functional properties between adult and aged microglia. Upper row: maximum intensity projection images of layer 2/3 imaged *in vivo* in the frontal/motor cortex of 5-month-old (left image; 30–68 μm depth, step 1 μm) and 18-month-old (right image; 9–47 μm depth, step 1 μm) CX3CR1⁺/GFP mice. All images were taken at similar illumination intensities. Blood vessels were labeled in red by an i.p. injection of the red fluorescent dye sulforhodamine B. Arrows point towards large lipofuscin granule inside the microglia. Lower row: a schematic drawing of an adult (left) and aged (right) microglial cells along with a list of morphological and functional features changing in the course of ageing (see text for further details). Colored arrows show the direction of change.

showed an increased mRNA expression of pro- (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory (IL-10, TGF- β) cytokines (Sierra et al., 2007), in line with the notion that low grade immune activation is a highly prominent feature of the cognitively normal aging brain (von Bernhardi et al., 2010; Cribbs et al., 2012; Baron et al., 2014).

Indeed, both in rodents and humans aging is accompanied by a widespread upregulation of immune/ inflammation-related genes (von Bernhardi et al., 2010; Cribbs et al., 2012), allowing Franceschi and colleagues to coin a new term describing the chronic pro-inflammatory status of the aged organism as “inflammaging” (Franceschi et al., 2007). In the brain inflammaging is mainly defined

by chronically increased expression levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-18 and a modulatory cytokine TGF- β , upregulation of the expression levels of caspase-1 (an enzyme responsible for L-1 β and IL-18 production), MHCII, complement receptor 3 (CD11b), as well as a downregulation of anti-inflammatory genes such as IL-10, IL-4 or brain-derived nerve growth factor (BDNF) (von Bernhardi et al., 2010; Cribbs et al., 2012; Norden and Godbout, 2013). As the brain’s immune system is mainly represented by microglia, microglia was thought to mediate the observed pro-inflammatory status of the aging brain. However, a more recent study specifically addressing the age-dependent changes in the gene

expression pattern of microglia by means of direct mRNA sequencing (without amplification or cDNA synthesis), challenged this established view by showing that several pro-inflammatory or neurotoxic pathways appeared to be downregulated in aged microglia while pathways involved in neuroprotection appeared to be upregulated (Hickman et al., 2013). Specifically, 24 out of 37 markers of “alternatively activated” M2 phenotype were significantly upregulated in aged microglia in contrast to 5 out of 12 markers of potentially neurotoxic M1 phenotype. In addition, the authors discovered a significant alteration in the expression pattern of genes required for sensing the microglia’s microenvironment. The transcripts associated with endogenous ligand recognition appeared to be downregulated, whereas those involved in pathogen recognition and neuroprotection were upregulated (Hickman et al., 2013). According to the authors, there was little change in the expression pattern of genes involved in phagocytosis, such as CD11b, CD14, CD68 and ICAM genes, suggesting that aged microglial cells might preserve their phagocytic ability. The authors concluded that aged “microglia retain their ability to defend against infectious pathogens and clear debris, but attempt to ‘tone down’ the stimulatory effects of endogenous debris, as if to keep from becoming constantly activated”.

It has to be mentioned, however, that the observed differential up- or downregulation of endogenous ligand recognition genes caused an alteration in a delicate balance between the ON and OFF signals. The transcripts encoding classical microglia-located OFF molecules such as TREM-2, DAP12, Siglecs or CD200R decreased with advancing age (Fig. 2), in parallel to a decrease in transcripts encoding the counterpart OFF molecules located on or released from neurons (e. g. CD200, CX3CL1(Fractalkine)) (Hickman et al., 2013; Wong, 2013; Grabert et al., 2016). At the same time, the expression of purinergic receptors (ATP is a classical ON signal), is differentially regulated by aging with an increase in the number of transcripts for P2X4 and a decrease in the number of transcripts for P2X7, P2Y12 and P2Y13 receptors (Hickman et al., 2013).

In summary, microglia in the aged brain face a different environment compared to their counterparts in the young adult brain, with a different relationship between ON and OFF signals and a mild chronic pro-inflammatory state. Therefore it is not surprising that many morphological and biochemical characteristics of senescent microglia point towards an activated phenotype. While the classical literature emphasizes the neurotoxic potential of senescent microglia, some recent studies suggest that microglia try to adapt to the changing environment, upregulate

their neuroprotective potential, keep calm and remain functional.

How does ageing of microglia influence its housekeeping functions?

The housekeeping functions of microglia include (i) provision of trophic support for surrounding neurons, (ii) monitoring and modulating the levels of synaptic activity, (iii) phagocytosis of accumulating extracellular debris and (iv) repairing microdamages of brain parenchyma. The trophic factors released by microglia include BDNF, supporting neuronal growth, differentiation, survival and learning-dependent synapse formation (Parkhurst et al., 2013), and TNF- α , required for neuroprotection during cerebral ischemia (Lambertsen et al., 2009). In addition, microglia-derived TNF- α plays a key role in controlling the amount of glutamate release from astrocytes, thus directly controlling neuronal firing as well as glutamate-induced neurotoxicity (Santello and Volterra, 2012). Furthermore, the contacts between microglial processes and neuronal somata were shown to decrease both spontaneous and sensory-driven neuronal activity (Li et al., 2012). As already mentioned above, ageing of microglia is accompanied by a decrease in the expression, and probably also release of BDNF, increased levels of TNF- α in the brain tissue and a decreased motility of microglial processes (von Bernhardi et al., 2010; Cribbs et al., 2012; Hefendehl, 2014 #443; Wong, 2013), all leading to decreased neuroprotection and increased extracellular levels of glutamate in the brain parenchyma. This potentiates activity of ageing neurons (Maier et al., 2014) and promotes glutamate-induced neurotoxicity.

The slower, less efficient movement of microglial process towards a lesion site (Hefendehl et al., 2014) decreases the ability of microglia to limit minute brain damages, caused, for example, by small ischemic events or ruptures of tiny blood vessels, increasing the size of the damaged brain tissue. In addition, these microdamages are the likely cause of the enhanced “spontaneous” calcium signaling in ageing microglia (Brawek et al., 2014). The increased intracellular calcium concentration, in turn, may activate many calcium dependent processes, such as processing and release of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 (Murakami et al., 2012) as well as nitric oxide (Hoffmann et al., 2003), leading to alterations in synaptic transmission and plasticity (Sama and Norris, 2013). A decreased

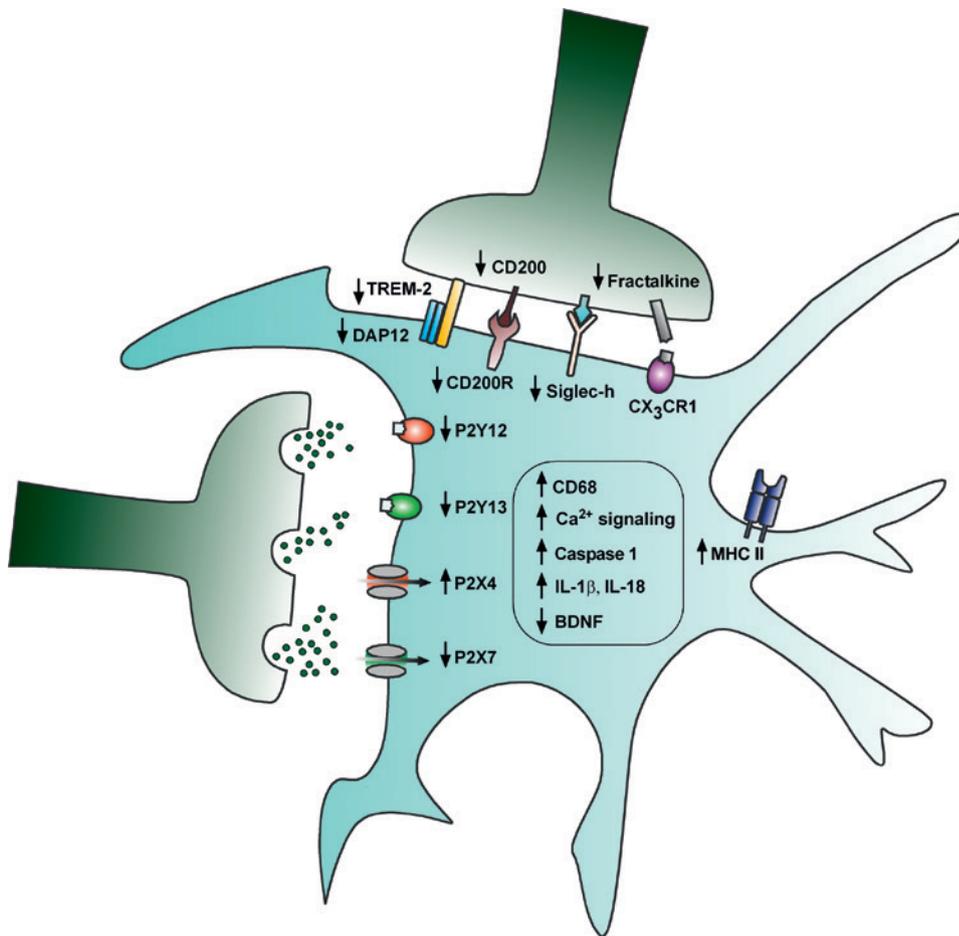


Fig. 2: Molecular make-up of the aged microglia. Microglial ageing is accompanied by changes in the expression patterns of OFF signals (e. g. TREM-2/DAP12, CD200R/CD200, Siglecs, CX3CR1/fractalkine), purinergic receptors (P2Y12, P2Y13, P2X4, P2X7), MHC II as well as an increase in the intracellular calcium signaling, causing an activation of calcium-sensitive signaling cascades.

motility of microglial processes might also decrease the efficiency of inflammation-induced displacement of axosomatic synapses by microglial processes, which was recently shown to be neuroprotective (Chen et al., 2014).

As specialized brain macrophages, aged microglia accumulate large amounts of lipofuscin granules (Fig. 1) as well as other types of noncellular inclusions and appear to be almost completely filled by cellular debris (Tremblay et al., 2012). This state is likely a byproduct of life-long phagocytic activities of microglia (in Greek “macrophage” literally means “big eater”) and points out to a possible exhaustion of its phagocytic capacity (Streit, 2006). Moreover, the expression of TREM-2, a microglial receptor promoting phagocytosis, is known to be downregulated with the advanced age (Fig. 2), in line with the assumed impairment of the phagocytic ability of microglia.

Thus, the mounting evidence suggests that all house-keeping properties of microglia are changing with advanc-

ing age and these changes often result in the deterioration of the microglial function.

How does ageing of microglia influence brain’s immune defense?

As the main immune cells of the brain, microglia react to acute injury, infections, or disease with a biphasic response starting with a rapid, pro-inflammatory activation phase, followed by a slower anti-inflammatory, neuroprotective tissue repair phase during the resolution of inflammation. The correct timing of both phases is necessary for efficient responses to injury and infections on the one hand and protection of the brain parenchyma from microglia-induced damage on the other (Wong, 2013). Accumulating evidence suggest that aged microglia generate

exaggerated pro-inflammatory responses to both peripheral and central immune challenges (reviewed in (Norden and Godbout, 2013; Wong, 2013)). The activation of the immune system by a peripheral injection of lipopolysaccharide (LPS), for example, causes a prolonged and exaggerated brain immune response accompanied with elevated expression levels of mRNA encoding IL-1 β , IL-6 and TNF- α and increased levels of respective proinflammatory cytokines. In addition, in the aged brain the mRNA expression levels of IL-1 β and TNF- α remained elevated for up to 72 hours after LPS injection and thus much longer than in the adult brain (up to 24 hours) (Richwine et al., 2008). The prolonged inflammatory response within the brain correlated well with the prolonged LPS-induced behavioral impairment of ageing experimental animals, characterized by a reduction of appetite and depressive withdrawal from normal social activities (Godbout et al., 2005; Norden and Godbout, 2013). Aged animals also show exaggerated immune responses to other stressors, such as hemorrhagic stroke, injury, neurotoxins or trauma (Wong, 2013). This partial loss of control over the brain's innate immune system might lead to a prolonged impairment of brain function, memory and cognition and, in the extreme case, also to neurodegeneration.

Microglia and age-related neurodegenerative disorders

Neurodegenerative disorders including, among others, Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's disease, are incurable diseases resulting in progressive functional impairment, degeneration and death of neural cells. Although each of the neurodegenerative disorders has its own etiology, many of them are associated with advancing age and with the deposition of abnormal proteins within the brain. Because of the worldwide ageing of the human population (the number of people over the age of 65 is expected to double over the next 15-20 years, with the fraction of oldest old (85+) increasing from 7% to 12% (Qiu et al., 2009)), these diseases will pose huge challenges to public healthcare systems across the world. Even nowadays dementias, among which Alzheimer's disease (AD) is the prevailing form, affect more than 25 million people worldwide. The hallmarks of AD include intracellular accumulations of hyperphosphorylated microtubule-associated protein tau, parenchymal accumulation of amyloid β deposits, synaptic loss and a progressive impairment of neuronal function, finally leading to a pronounced neuronal death.

Recent Genome Wide Association Studies have identified many genes related to microglia and/or immune response, mutations in which are associated with an increased risk of late-onset AD, the most prevalent form of the disease (Villegas-Llerena et al., 2016). Moreover, the risk associated with a specific mutation in the gene encoding the TREM2 protein is as high as the one associated with the ϵ 4 allele of the apolipoprotein E, until recently the only known genetic risk factor associated with late-onset AD. However, the difference in the expression of the immune-related genes between young and old healthy subjects seems to be much larger than the one between healthy subjects and AD patients of the same age (Cribbs et al., 2012). These results support the notion that inflammaging in general and the increased reactivity of the aged microglia in particular might promote the development of AD. One of the possible mechanisms connecting inflammaging and AD was recently discovered by Beth Stevens' group. They showed that the classical complement cascade-mediated pathways, which normally contribute to synaptic pruning of excess synapses during early post-natal development, cause engulfment and elimination of synapses by microglia in the amyloid-depositing brain (Hong et al., 2016).

Both in humans and in mouse models of AD microglial cells, especially those located in the immediate vicinity of the amyloid β accumulations (so-called senile plaques), have an activated morphology (see, for example, Fig. 1 in (Brawek et al., 2014)) and an increased expression of pro-inflammatory markers such as MHC II and CD68 (Norden et al., 2015). Moreover, plaque-associated microglia undergo a dramatic functional impairment with more than 80% of cells becoming "hyperactive" in respect to their ongoing calcium signaling (Brawek et al., 2014). In parallel, microglia in the amyloid-depositing brain show a reduced phagocytic activity and impaired responses to cell/tissue damage in their vicinity (Krabbe et al., 2013; Brawek et al., 2014), thus failing to sufficiently protect the surrounding tissue. Of note, TREM2 and CD33, recently identified as AD risk genes, are implicated in microglial phagocytosis (Norden et al., 2015). While the latter findings point towards amyloid-induced microglial senescence, an exaggerated microglial calcium signaling alludes towards the increased reactivity of plaque-associated microglia. As already mentioned above for normally aged microglia, the increased intracellular calcium concentration may cause processing and release of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 via the caspase-1-mediated pathway, release of nitric oxide and activation of the calcium-dependent protein phosphatase calcineurin, upregulating cytokine expression via activation of the nuclear factor of activated

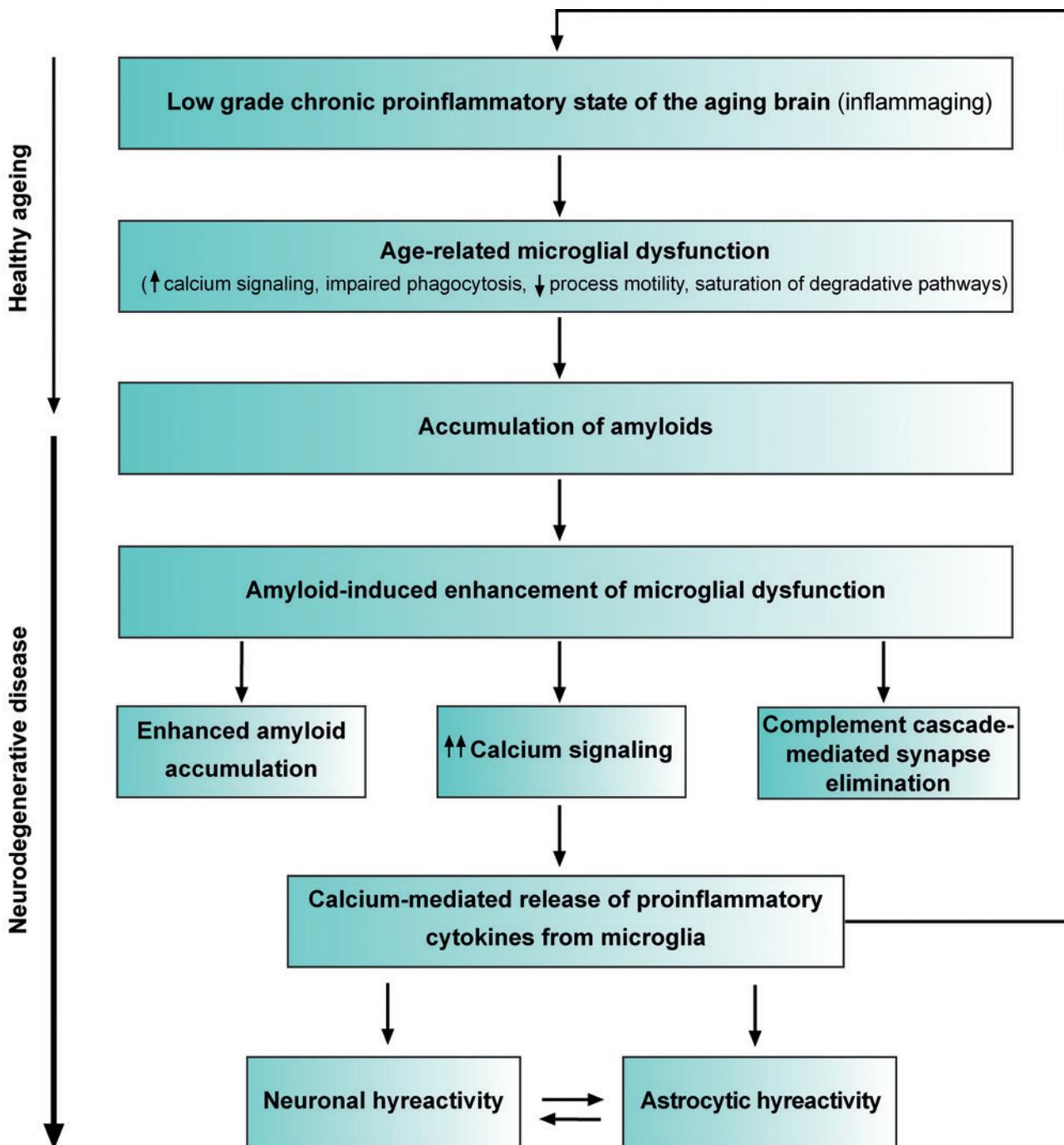


Fig. 3: A flow chart illustrating an inflammaging-based hypothesis of the development of neurodegenerative diseases (see text for details).

T-cells (Felderhoff-Mueser et al., 2005; Sama and Norris, 2013). Interestingly, an NLRP3 inflammasome, a multiprotein complex activating caspase-1, itself requires increased intracellular calcium levels for activation and this activation is enhanced in both human and mouse AD brains (Murakami et al., 2012; Norden et al., 2015). Moreover, genetic deletion of NLRP3 inflammasome reduces plaque

burden in AD mice and protects them from loss of spatial memory (Heneka et al., 2013).

Although the fact that amyloid deposition inside the AD brain causes activation of glial cells is known since the pioneering work of Alois Alzheimer, till recently the activated microglia was seen as a late consequence of amyloidosis, as a bystander either potentiating or failing to cope with the ongoing pathology. Only recently it became

apparent that age-related microglial dysfunction, as for example, a decrease in its phagocytic ability (see above), might be crucial for age-dependent accumulation of amyloids (i.e. abnormal protein aggregates) in the first place (Fig. 3).

Thus, low grade inflammation within the ageing brain and inflammaging-associated microglial dysfunction result in the reduced efficiency of microglial surveillance because of the reduced process motility paralleled by the impaired phagocytosis due to saturation of microglia's degradative pathways. Under these conditions naturally produced amyloids cannot be efficiently found and eliminated by microglia and therefore accumulate in the brain parenchyma, causing further microglial dysfunction. This amyloid-induced dysfunction potentiates microglial senescence, triggers complement cascade-dependent synapse elimination and further exaggerates intracellular calcium dyshomeostasis in microglia. The latter boosts the production of pro-inflammatory cytokines (e. g. TNF- α and IL- β) via different calcium-dependent pathways (e. g. activation of caspase-1, calcineurin or NF κ B (Sama and Norris, 2013)). The pro-inflammatory cytokines (i) potentiate the inflammation within the ageing brain thus closing the vicious cycle and (ii) cause the hyperactivity of calcium signaling in neurons and astrocytes (Santello and Volterra, 2012; Brawek and Garaschuk, 2014), exacerbating amyloid-induced dysfunction of neural networks (Fig. 3). Although this hypothesis still needs a rigorous experimental validation, its plausibility moves microglia and inflammaging in the very center of AD-related pathological events and allows to view AD, but likely also some other neurodegenerative disorders, as a direct consequence of the age-related dysfunction of the brain's immune system.

Acknowledgments: I thank K. Riester and M. Olmedillas del Moral for providing data for Fig. 1, A. Kaupp for graphic support as well as B. Brawek and B. Kovalchuk for comments on the manuscript. This work was supported by the Alzheimer Forschung Initiative e. V. (grant no. 14812) and VolkswagenStiftung (grant no. 90233).

Glossary

- TREM-2** (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), an immunoglobulin inhibiting inflammatory responses in macrophages. In the brain TREM-2 is exclusively expressed by microglia.
- DAP12** (DNAX-activating protein 12 kDa), an adaptor molecule used by TREM-2 for intracellular signaling.

- Siglecs** (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins), immunoglobulins binding to sialic acid. Under physiological conditions the recognition of sialic acids on the neuronal glycocalyx seems to signal cellular integrity inhibiting microglia activation.
- CX3CL1** (CX3C ligand, fractalkine), a cytokine involved in the adhesion and migration of leukocytes.
- CX3CR1** (CX3C chemokine receptor 1), receptor for the chemokine fractalkine.
- MHCII** (major histocompatibility complex II), a surface protein normally found only on antigen-presenting cells.
- ROS** (reactive oxygen species), reactive chemical species containing oxygen. Under physiological conditions ROS are involved in cell signaling and homeostasis, at high concentrations they cause cell damage via oxidative stress.
- BDNF** (brain-derived neurotrophic factor), a growth factor critically important for neuronal differentiation and survival.
- TNF- α** (tumor necrosis factor α), one of the key pro-inflammatory cytokines produced by activated macrophages.
- TGF- β** , (transforming growth factor β), an immunosuppressive cytokine secreted by many cell types, including macrophages.
- IL-1 β** (interleukin-1 β), one of the key pro-inflammatory cytokines. IL-1 β is involved in many processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, inflammatory pain hypersensitivity, etc.
- IL-6** (interleukin-6), a pro-inflammatory cytokine secreted by macrophages and T cells. IL-6 is an important mediator of fever and of the acute phase response.
- IL-4** (interleukin-4), an anti-inflammatory cytokine playing an important role in wound repair.
- IL-10** (interleukin-10), an anti-inflammatory cytokine inhibiting LPS-mediated induction of pro-inflammatory cytokines.
- CD11b** (cluster of differentiation molecule 11b), a surface molecule expressed by many leukocytes, including monocytes, granulocytes, macrophages, and natural killer cells. Under inflammatory conditions it regulates chemotaxis, leukocyte adhesion, cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis.
- CD14** (cluster of differentiation molecule 14), a surface molecule expressed mainly by macrophages acting as a co-receptor for the detection of LPS.
- CD68** (cluster of differentiation molecule 68), a glycoprotein found in lysosomal and surface membranes of myeloid cells. CD68 is indicative of phagocytic capability.
- CD33** or **Siglec-3** (sialic acid binding Ig-like lectin 3), a sialic acid receptor expressed on myeloid cells.
- ICAMs** (intercellular adhesion molecules), immunoglobulins, continuously present in low concentrations in the membranes of leukocytes.
- CD200** (cluster of differentiation molecule 200), an immunoglobulin regulating myeloid cell activity and delivering an inhibitory signal to macrophages.
- CD200R**, receptor for cluster of differentiation molecule 200. In the CNS, microglial cells express CD200R, while CD200 is expressed on the membrane of neurons and astrocytes. Together this ligand-receptor pair inhibits inflammatory responses of microglia.
- LPS** (Lipopolysaccharide), component of bacterial cell wall of Gram-negative bacteria provoking innate immune response.
- ApoE** (Apolipoprotein E), a class of apolipoproteins transporting lipoproteins, fat-soluble vitamins, and cholesterol.

References

- Askew K., Li K., Olmos-Alonso A., Garcia-Moreno F., Liang Y., Richardson P., Tipton T., Chapman M. A., Riecken K., Beccari S., Sierra A., Molnár Z., Cragg M. S., Garaschuk O., Perry V. H., Gomez-Nicola D. (2017). Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. *Cell Rep* 18:391-405.
- Baron R., Babcock A. A., Nemirovsky A., Finsen B., Monsonego A. (2014). Accelerated microglial pathology is associated with A beta plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 13:584-595.
- Biber K., Neumann H., Inoue K., Boddeke H. W. (2007). Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci* 30:596-602.
- Brawek B., Garaschuk O. (2014). Network-wide dysregulation of calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res*:427-438.
- Brawek B., Schwendele B., Riester K., Kohsaka S., Lerdkrai C., Liang Y., Garaschuk O. (2014). Impairment of in vivo calcium signaling in amyloid plaque-associated microglia. *Acta Neuropathol* 127:495-505.
- Chen Z., Jalabi W., Hu W., Park H. J., Gale J. T., Kidd G. J., Bernatowicz R., Gossman Z. C., Chen J. T., Dutta R., Trapp B. D. (2014). Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun* 5:4486.
- Cribbs D. H., Berchtold N. C., Perreau V., Coleman P. D., Rogers J., Tenner A. J., Cotman C. W. (2012). Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J. Neuroinflammation* 9:179.
- Cunningham C. L., Martinez-Cerdeno V., Noctor S. C. (2013). Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci* 33:4216-4233.
- Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J. V., Zuo Y., Jung S., Littman D. R., Dustin M. L., Gan W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758.
- Eichhoff G., Busche M. A., Garaschuk O. (2008). In vivo calcium imaging of the aging and diseased brain. *Eur J. Nucl Med Mol Imaging* 35 Suppl 1:S99-106.
- Felderhoff-Mueser U., Schmidt O. I., Oberholzer A., Bührer C., Stahel P. F. (2005). IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? *Trends Neurosci* 28:487-493.
- Franceschi C., Capri M., Monti D., Giunta S., Olivieri F., Sevini F., Panourgia M. P., Invidia L., Celani L., Scurti M., Cevenini E., Castellani G. C., Salvioli S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 128:92-105.
- Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M. F., Conway S. J., Ng L. G., Stanley E. R., Samokhvalov I. M., Merad M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845.
- Godbout J. P., Chen J., Abraham J., Richwine A. F., Berg B. M., Kelley K. W., Johnson R. W. (2005). Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J.* 19:1329-1331.
- Grabert K., Michoel T., Karavolos M. H., Clohisey S., Baillie J. K., Stevens M. P., Freeman T. C., Summers K. M., McColl B. W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* 19:504-516.
- Hanisch U. K., Kettenmann H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Hefendehl J. K., Neher J. J., Suhs R. B., Kohsaka S., Skodras A., Jucker M. (2014). Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell* 13:60-69.
- Heneka M. T., Kummer M. P., Stutz A., Delekate A., Schwartz S., Vieira-Saecker A., Griep A., Axt D., Remus A., Tzeng T. C., Gelpi E., Halle A., Korte M., Latz E., Golenbock D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493:674-678.
- Hickman S. E., Kingery N. D., Ohsumi T. K., Borowsky M. L., Wang L. C., Means T. K., El Khoury J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* 16:1896-1905.
- Hoffmann A., Kann O., Ohlemeyer C., Hanisch U. K., Kettenmann H. (2003). Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *J. Neurosci* 23:4410-4419.
- Hong S., Beja-Glasser V. F., Nfonoyim B. M., Frouin A., Li S. M., Ramakrishnan S., Merry K. M., Shi Q. Q., Rosenthal A., Barres B. A., Lemere C. A., Selkoe D. J., Stevens B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352:712-716.
- Krabbe G., Halle A., Matyash V., Rinnenthal J. L., Eom G. D., Bernhardt U., Miller K. R., Prokop S., Kettenmann H., Heppner F. L. (2013). Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *Plos One* 8:e60921.
- Lambertsen K. L., Clausen B. H., Babcock A. A., Gregersen R., Fenger C., Nielsen H. H., Haugaard L. S., Wirenfeldt M., Nielsen M., Dagnaes-Hansen F., Bluethmann H., Faergeman N. J., Meldgaard M., Deierborg T., Finsen B. (2009). Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J. Neurosci* 29:1319-1330.
- Li Y., Du X. F., Liu C. S., Wen Z. L., Du J. L. (2012). Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Developmental Cell* 23:1189-1202.
- Maier F. C., Wehrli H. F., Schmid A. M., Mannheim J. G., Wiehr S., Lerdkrai C., Calaminus C., Stahlschmidt A., Ye L., Burnet M., Stiller D., Sabri O., Reischl G., Staufenbiel M., Garaschuk O., Jucker M., Pichler B. J. (2014). Longitudinal PET-MRI reveals beta-amyloid deposition and rCBF dynamics and connects vascular amyloidosis to quantitative loss of perfusion. *Nat Med* 20:1485-1492.
- Miyamoto A., Wake H., Ishikawa A. W., Eto K., Shibata K., Murakoshi H., Koizumi S., Moorhouse A. J., Yoshimura Y., Nabekura J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun* 7:12540.
- Murakami T., Ockinger J., Yu J., Byles V., McColl A., Hofer A. M., Horng T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:11282-11287.

- Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Norden D. M., Godbout J. P. (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *NeuroPathol Appl Neurobiol* 39:19-34.
- Norden D. M., Muccigrosso M. M., Godbout J. P. (2015). Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacol* 96:29-41.
- Paolicelli R. C., Bolasco G., Pagani F., Maggi L., Scianni M., Panzanelli P., Giustetto M., Ferreira T. A., Guiducci E., Dumas L., Ragozzino D., Gross C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.
- Parkhurst C. N., Yang G., Ninan I., Savas J. N., Yates J. R., Lafaille J. J., Hempstead B. L., Littman D. R., Gan W. B. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155:1596-1609.
- Qiu C., Kivipelto M., von Strauss E. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 11:111-128.
- Richwine A. F., Parkin A. O., Buchanan J. B., Chen J., Markham J. A., Juraska J. M., Johnson R. W. (2008). Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult and aged mice after peripheral immune stimulation. *Psychoneuroendocrinol* 33:1369-1377.
- Safaiyan S., Kannaiyan N., Snaidero N., Brioschi S., Biber K., Yona S., Edinger A. L., Jung S., Rossner M. J., Simons M. (2016). Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat Neurosci* 19:995-998.
- Sama D. M., Norris C. M. (2013). Calcium dysregulation and neuroinflammation: discrete and integrated mechanisms for age-related synaptic dysfunction. *Ageing Res Rev* 12:982-995.
- Santello M., Volterra A. (2012). TNF alpha in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci* 35:638-647.
- Schafer D. P., Lehrman E. K., Kautzman A. G., Koyama R., Mardinly A. R., Yamasaki R., Ransohoff R. M., Greenberg M. E., Barres B. A., Stevens B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.
- Sierra A., Gottfried-Blackmore A. C., McEwen B. S., Bulloch K. (2007). Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 55:412-424.
- Squarzone P., Oller G., Hoeffel G., Pont-Lezica L., Rostaing P., Low D., Bessis A., Ginhoux F., Garel S. (2014). Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Rep* 8:1271-1279.
- Streit W. J. (2006). Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* 29:506-510.
- Streit W. J., Sammons N. W., Kuhns A. J., Sparks D. L. (2004). Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45:208-212.
- Tremblay M. E., Zettel M. L., Ison J. R., Allen P. D., Majewska A. K. (2012). Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia* 60:541-558.
- Villegas-Llerena C., Phillips A., Garcia-Reitboeck P., Hardy J., Pocock J. M. (2016). Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 36:74-81.
- von Bernhardi R., Tichauer J. E., Eugenin J. (2010). Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J. Neurochem* 112:1099-1114.
- Wake H., Moorhouse A. J., Miyamoto A., Nabekura J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* 36:209-217.
- Wong W. T. (2013). Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci* 7:22.
- Wu Y., Dissing-Olesen L., MacVicar B. A., Stevens B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol* 36:605-613.
- Zhao Z., Nelson A. R., Betsholtz C., Zlokovic B. V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 163:1064-1078.

Article note: German version available at <https://doi.org/10.1515/nf-2016-0057>

Bionotes



Prof. Dr. Olga Garaschuk

Institute of Physiology II, University of Tübingen Keplerstr. 15, 72074 Tübingen, Germany

Phone: +49-07071 29 73640

Fax: +49-07071 29 5395

Mail: olga.garaschuk@uni-tuebingen.de

Prof. Dr. Olga Garaschuk (born 1966 in Kyiv, Ukraine) studied physico-chemical biology at the Moscow Institute of Physics and Technology (1983-1989, diploma with distinction) and obtained her PhD in 1992 at the Bogomoletz Institute of Physiology (Kyiv). Between 1992 and 1997 she worked as a research assistant at the Bogomoletz Institute of Physiology (Kyiv), the Max Planck Institute for Biophysical Chemistry (Göttingen) and the Institute of Physiology at the University of Saarland. In 2003 she obtained her habilitation in physiology at the Faculty of Medicine of the Ludwig-Maximilians-University (Munich). In 2006 she got a Professorship for Neuronal Imaging (W2) at the Institute of Neurosciences, Technical University of Munich. Since 2008 she is Full Professor (W3), Chair of the Institute of Physiology II, University of Tübingen. Prof. Garaschuk's research is dedicated to functional analyses of neuronal networks in vivo, in particular with regard to adult neurogenesis, interaction between the nervous and the immune systems of the brain, as well as aging and neurodegeneration.

Institutsvorstellungen

Ute Habel* und Ruben C. Gur*

DFG-Graduiertenkolleg 2150 „Neuronale Grundlagen der Modulation von Aggression und Impulsivität im Rahmen von Psychopathologie“

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-0026>

Zusammenfassung: Im April 2016 nahm das neue internationale Graduiertenkolleg 2150 (IRTG 2150) mit dem Titel „Neuronale Grundlagen der Modulation von Aggression und Impulsivität im Rahmen von Psychopathologie“ offiziell seine Arbeit auf. Institutionell setzt sich das internationale GRK zusammen aus (1) der Jülich-Aachen-Research-Alliance (JARA), einer Vernetzung der RWTH Aachen und dem Forschungszentrum Jülich, speziell der Sektion JARA-BRAIN, sowie (2) der renommierten University of Pennsylvania in den USA. Beide Standorte verbindet eine seit vielen Jahren bestehende enge wissenschaftliche Beziehung, die auf einer erfolgreichen Zusammenarbeit im vorangehenden gemeinsamen Internationalen Graduiertenkolleg zu Schizophrenie und Autismus (IRTG 1328, Sprecher: Frank Schneider) beruht und die in diesem neuen Verbund weiter ausgebaut werden soll. Das Graduiertenkolleg dient der wissenschaftlich-akademischen Qualifizierung auf dem Gebiet der klinischen, translationalen, molekularen und systemischen Neurowissenschaften. Zwölf Professoren aus unterschiedlichen wissenschaftlichen Disziplinen, wie Medizin, Psychologie, Biologie, Elektrotechnik und Physik bekommen jeweils eine Doktorandenstelle von der DFG finanziert. Hinzu kommen

***Korrespondenzautoren:** Ute Habel, 1. Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik, Medizinische Fakultät, RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen, Germany, 2. JARA – Translational Brain Medicine, Aachen, E-Mail: uhabel@ukaachen.de; Institut für Neurowissenschaften und Medizin, INM 10: JARA Institute Brain Structure Function Relationship, Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Web: <https://www.ukaachen.de/kliniken-institute/klinik-fuer-psychiatrie.../habel-ute.html>, <http://www.jara.org/de/research/jara-brain/>

Ruben C. Gur, Departments of Psychiatry, Radiology and Neurology, Brain Behavior Laboratory and Center for Neuroimaging in Psychiatry, 3400 Spruce Street, School of Medicine University of Pennsylvania and the Philadelphia Veterans Administration Medical Center, Philadelphia, PA 19104, E-Mail: gur@upenn.edu

aktuell zehn assoziierte Doktoranden und fünf Medizinstudenten, die in Deutschland promovieren sowie weitere zehn Doktoranden, die an der University of Pennsylvania eingeschrieben sind. Mehrere Postdocs auf beiden Seiten vervollständigen die Gruppe.

Schlüsselwörter: pathologische Aggression/Impulsivität; klinische & translationale Neurowissenschaften; Neuromodulation & psychologische Intervention; Qualifikation & Mentoring

Keywords: pathological aggression/impulsivity; clinical & translational neuroscience; neuromodulation & psychological intervention; qualification & mentoring

Einleitung: Das IRTG 2150 stellt sich vor

Im Rahmen dieses zunächst für 4,5 Jahre bewilligten Graduiertenkollegs stehen die Untersuchung und Erforschung zentralnervöser, insbesondere neurobiologischer Mechanismen pathologischer Aggression und Impulsivität im Mittelpunkt. Für diese Forschungsbestrebungen stellt die DFG ein Gesamtfördervolumen von rund 5 Millionen Euro zur Verfügung. Die Neurobiologie pathologischer Aggression und Impulsivität ist ein aktuelles klinisch wie gesellschaftlich hoch relevantes Thema. In der Klinik stellen Patienten mit pathologischen aggressiven Symptomen eine enorme Herausforderung für die Therapie dar. Impulsivität und Aggressivität sind multifaktorielle Phänomene und ihre neurobiologischen Grundlagen sind weitestgehend unbekannt. Um die zugrunde liegenden neurobiologischen Prozesse tiefgehend und umfassend zu entschlüsseln, werden Bildgebung und Verhaltensforschung mit neuropsychologischen, elektrophysiologischen, neuroendokrinen und molekularen Ansätzen kombiniert. Dabei werden in einem translationalen Vorgehen

Mensch- und Tiermodelle miteinander verbunden, um zwei Fragestellungen zu verfolgen: 1) Den Einfluss von Faktoren wie Umwelt, traumatische Erfahrungen, Persönlichkeit, Alter, Geschlecht, Kultur und (epi-)genetische Faktoren auf aggressives und impulsives Verhalten sowie die zugrunde liegenden neuronalen Netzwerke und Neurotransmittersysteme zu erforschen; 2) Aggressives Verhalten und zerebrale Konnektivität durch neuromodulatorische, psychologische und psychopharmakologische Methoden zu modulieren (Abb. 1). Übergeordnetes Ziel ist es, die zugrunde liegenden Netzwerke zu charakterisieren sowie neue therapeutische Interventionen zu entwickeln.

Die Forschungsthematik

Gemäß der geläufigsten Definitionen ist Aggression „jegliches Verhalten, das gegen ein anderes Individuum gerichtet ist, mit der Absicht Schaden zuzufügen“ (Anderson und Bushman, 2002). Als solche ist Aggression Teil des emotionalen Antwortmusters auf Frustration und Bedrohung bei Mensch und Tier und spielt eine bedeutende evolutionäre Rolle. Dabei wird häufig zwischen reaktiver und instrumenteller Aggression differenziert. Erstere ist impulsiv, feindselig und emotional, letztere dagegen vorwiegend, proaktiv und zielorientiert. Reaktive Aggression ist damit eng verknüpft mit Impulsivität. Impulsivität kann als Tendenz definiert werden, aus dem Impuls heraus, ohne Überlegung und Plan oder die Berücksichtigung von Konsequenzen zu handeln (American Psychiatric Association, APA, 2013). Dieses Konstrukt ist breiter und beinhaltet Aspekte wie eingeschränkte Fähigkeiten zur Inhibition, Schwierigkeiten im Belohnungsaufschub und vorschnelle Entscheidungen. Untersuchungen bei Nagern konnten zeigen, dass fehlende Hemmung und Impulskontrolle zentrale Aspekte der Aggression sind, auch wenn Korrelationen zwischen beiden Konstrukten nicht immer nachweisbar sind. Interessanterweise wird in neuerer Zeit auch die appetitive Aggression stärker untersucht (Elbert et al., 2017). Sie stellt die biologische Prädisposition des Menschen zur genuinen Lust an Gewalt im Einzel- oder Gruppenszenario dar (z. B. Krieg, Hooliganismus).

Aggression und Impulsivität sind das Ergebnis komplizierter Wechselwirkungen biologischer, sozialer, situationaler, kultureller, psychologischer und persönlicher Faktoren. Studien zum neuronalen Netzwerk der Aggression beruhen auf Untersuchungen von Patienten mit pathologischer Aggression, Tierstudien sowie Bildgebungsstudien mit experimentellen Ansätzen zur Ärgerprovokation oder Emotionsregulation. Den Ergebnissen zufolge scheint

reaktive Aggression auf ein Ungleichgewicht von unzureichender präfrontaler (orbitofrontaler (OFC), medial präfrontaler (MPFC), ventro- und dorsolateral präfrontaler (VL-, DLPFC)) und anterior cingulärer (ACC) top-down Kontrolle und gesteigerter bottom-up Aktivität limbischer, „emotionaler“ Regionen zurückzugehen. Zusammen mit dem Amygdala-Hypothalamus-PAG (periaquäduktales Grau) System, das grundlegende Reaktionen auf Bedrohung moduliert sowie dem Hippokampus und der Inselregion bilden diese Regionen das Aggressionsnetzwerk (Nelson und Trainor, 2007). Dieses Netzwerk kontrolliert aggressives Verhalten, moduliert Reaktionen auf Provokation und wird bei Reaktionen auf implizite und explizite Aggressionsreize aktiviert. Die reduzierte Funktion des präfrontalen Kortex ist dabei das mit am besten replizierte zerebrale Korrelat aggressiven Verhaltens. Eine Metaanalyse von 43 Bildgebungsstudien von Individuen mit pathologischer Aggression zeigte Volumen- und Funktionsminderungen des OFC, ACC und DLPFC (Yang und Raine, 2009), wobei besonders letzterer eine Schlüsselrolle bei der Emotionsregulation und -verarbeitung sowie insbesondere auch bei aggressivem Verhalten von Gesunden und Patienten innehat.

Die Forschung im IRTG im Rahmen der Dissertationsprojekte widmet sich der Analyse zeitlicher und räumlicher Korrelate des neuronalen Netzwerkes der Aggression und Impulsivität sowie der Konnektivität innerhalb dieses Netzwerkes. Situationales aggressives/impulsives Verhalten und das Persönlichkeitsmerkmal der Aggression und Impulsivität werden miteinander in Beziehung gesetzt und bezüglich Unterschieden und Überlappungen der jeweiligen Konstrukte analysiert. Darüber hinaus wird der Einfluss weiterer Faktoren auf die Entstehung von Aggression berücksichtigt und diese bezüglich ihrer Wirkung auf das Netzwerk charakterisiert (Abb. 1). Es werden neue experimentelle Paradigmen zur Induktion von Aggression und Impulsivität entwickelt und validiert sowie in bildgebenden Untersuchungen bei Gesunden und Patienten mit psychischen Störungen eingesetzt. Dadurch kann der enge Bezug zwischen Aggression und Impulsivität weiter analysiert und spezifiziert werden.

Im klinischen Kontext sind impulsives und aggressives Verhalten Bestandteil zahlreicher neuropsychiatrischer Störungen, darunter Verhaltensstörungen, Borderline und antisoziale Persönlichkeitsstörungen, Alkoholabhängigkeit, Schizophrenie, affektive Störungen, Aufmerksamkeits-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), Autismus, Demenz, Chorea Huntington oder Parkinson-Erkrankung. Als Symptome oder Syndrome beeinträchtigen sie häufig den Krankheitsverlauf und das soziale Funktionsniveau. Besonders reaktive Aggression kann dabei als

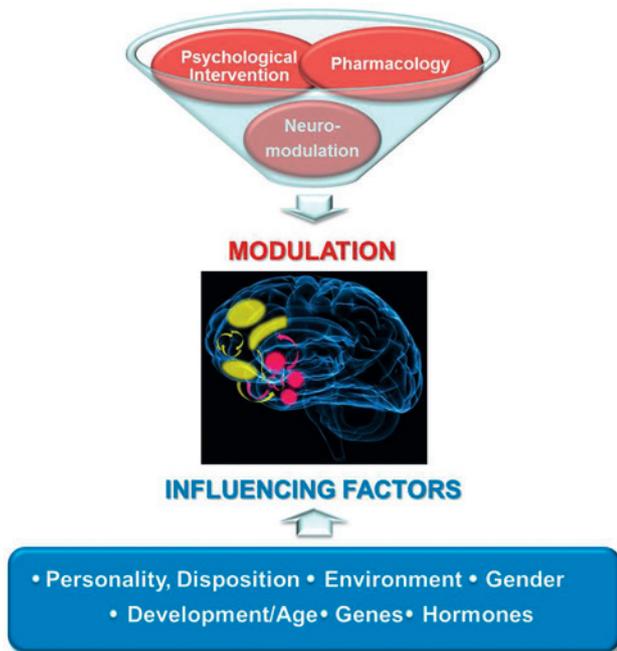


Abb. 1: Forschungsmodell, das die unterschiedlichen Aspekte zeigt, die untersucht werden können

Endophänotyp mit klaren biologischen Einflüssen aufgefasst werden. Einer Annahme zufolge beruht Aggression auf drei Mechanismen: 1) einer Störung im zugrunde liegenden zerebralen Aggressionsnetzwerk; 2) einem Hypoarousal aufgrund chronisch reduzierter Plasma – Glukokortikoidspiegel – durch die Spiegelreduktion wird die Inhibition aggressiver Tendenzen aufgehoben (z. B. bei Verhaltensstörungen, antisozialen Persönlichkeitsstörungen); und (3) einem Hyperarousal, das zu Irritabilität und emotionalen Ausbrüchen führt (z. B. bei Depression oder Borderline; (Haller und Kruk, 2006)). Die aktuellen Promotionsthemen im IRTG streben ein besseres Verständnis aggressiven und impulsiven Verhaltens über die Lebensspanne sowie ihrer pathologisch veränderten neurobiologischen Grundlagen bei ADHS, Alkoholabhängigkeit, Schizophrenie und Chorea Huntington an. Da Aggression in ihrer evolutionären Funktion jedoch Teil unseres Verhaltensmusters und Emotionserlebens ist, ist neben dem Verständnis der pathologischen Aggression vor allem die Möglichkeit ihrer effektiven Kontrolle und Regulation wesentlich. Ein langfristiges Ziel der Forschung im IRTG ist daher die Entwicklung und experimentelle Validierung von innovativen Interventionen, die dieses maladaptive Verhalten erfolgreich reduzieren können. Wir beabsichtigen daher, das zerebrale Netzwerk der Aggression und Impulsivität durch verschiedene Methoden zu modulieren, um unser Wissen über Interventions- und Reduktionsmög-

lichkeiten pathologischer Aggression und Impulsivität zu erweitern. Hierfür werden in einigen Dissertationsprojekten vor allem transkranielle Gleichstromstimulation und Neurofeedback eingesetzt, um Verhalten und zerebrale Netzwerke bei Gesunden und Patienten zu modulieren. Gleichzeitig werden im Rahmen dieser Untersuchungsansätze auch Einflüsse von Persönlichkeitsvariablen und Genetik berücksichtigt. Letzteres ist von besonderem Interesse, da Aggression eine hohe Heritabilität besitzt, wobei ein direkter Bezug von Genotyp zu aggressivem Verhalten schwierig ist. Aggression ist kein homogenes Konstrukt, sondern variiert in Abhängigkeit von seiner Intention (z. B. Schadensbegrenzung, Stressreaktion etc.). Zudem haben Umweltfaktoren einen großen Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps. Die Forschung im IRTG versucht daher Endophänotypen mit bildgebenden Methoden zu identifizieren, um über die interindividuelle Varianz in den Bildgebungsdaten gemeinsame genetische Varianten zu bestimmen, die Hirnstruktur oder –funktion beeinflussen. Es wurden einige Kandidatengene identifiziert, die bei Aggression besonders in einer Gen-Umwelt-Interaktion eine Rolle spielen, darunter MAOA-Gen (Monoaminoxidase) und das Serotonintransporter Gen (5-HTT, 5-Hydroxytryptamintransporter), aber auch COMT (Catechol-O-Methyltransferase) und BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). Sie reflektieren gleichzeitig die Rolle der bei Aggression und Impulsivität involvierten Transmittersysteme – hier im besonderen Maße das serotonerge und dopaminerge System. Einige dieser genetischen Einflüsse werden in den Dissertationsprojekten bei Mensch und Tier berücksichtigt und analysiert.

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit Aggression und Impulsivität im IRTG 2150 durch Promotionsprojekte aufgegriffen wird, sind geschlechts- und stresshormonelle Einflüsse sowie der Einfluss olfaktorischer Reize. Auch hier ergänzen sich Tiermodelle und Humanforschung. Tierstudien untersuchen chemosensorische Signalübertragungswege im olfaktorischen System von Nagern, während im Fall der Humanstudien besonders soziale Chemosignale in ihrer Wirkung auf Aggression von Interesse sind, wie z. B. Angst- oder Aggressionsgerüche. Ferner sollen die zusätzlichen Modulationen durch Testosteron, Cortisol und Arginin Vasopressin in ihrer Wirkung auf aggressives und impulsives Verhalten untersucht werden.

Von seinem klinischen Grundsatz her reflektiert das IRTG 2150 damit eine Kombination traditionell kategorialer und insbesondere dimensionaler Klassifikationsansätze. Diese dimensionale Perspektive entspricht aktuellen Entwicklungen und Forschungsergebnissen im Bereich der Psychiatrie, die zeigen, dass Symptome, genetisches

Risiko für psychische Störungen und zerebrale Korrelate des Verhaltens möglicherweise besser auf einem Kontinuum darstellbar sind.

Qualifikationsprogramm

Das IRTG bereitet junge (klinisch und grundlagenwissenschaftlich arbeitende) Wissenschaftler optimal vor, um diese aktuellen Entwicklungen und Herausforderungen anzugehen und unser Verständnis der neurobiologischen Grundlagen pathologischer Aggression und Impulsivität besser zu verstehen. Zu diesem Zweck haben die Antragsteller ein umfassendes, einzigartiges Qualifikationsprogramm entwickelt, das auf den drei Prinzipien klinisch relevanter Forschung, internationalem Austausch und wissenschaftlicher Synergie beruht (Abb. 2). Es soll die wissenschaftliche Exzellenz und Unabhängigkeit der Doktoranden fördern und gleichzeitig ausreichend Unterstützung gewähren. Das IRTG bietet hierfür ein gemeinsames strukturiertes Curriculum, interdisziplinäre Ausbildung und individualisierte Supervision von deutscher und amerikanischer Seite. Dabei betont das Qualifikationsprofil innovative Aspekte, darunter die systematische Integration moderner Medien für einen intensiven deutsch-amerikanischen Austausch.

Hauptbestandteil des Curriculums sind die zweiwöchentlichen Meetings, die abwechselnd intern oder extern gestaltet werden. Die internen Meetings beinhalten Projektpräsentationen der Doktoranden und die Diskussion der Ergebnisse bzw. des Projektfortschritts, in den externen Meetings präsentieren eingeladene renommierte nationale und internationale Wissenschaftler und Experten neueste Forschungsergebnisse. Elektronische Medien unterstützen den internationalen Austausch. Hierzu werden alle Vorträge aufgezeichnet, zum einen, um den Doktoranden Feedback für das individuelle Training von Präsentationsfertigkeiten geben und die Präsentationen dem amerikanischen Supervisor zugänglich machen zu können, zum anderen, um die externen Vorträge für beide Partnerseiten und folgende Generationen im Sinne einer Vortragsreihe zum Thema zur Verfügung zu stellen. Das Kursangebot wird ergänzt durch einen Journal Club, der von Postdocs begleitet wird und weiteren klinischen und methodologischen ein bis zwei Tages-Workshops, deren Wahl und Zusammenstellung ebenfalls nach Interesse und Fortbildungswunsch der Doktoranden erfolgt (ca. zehn bis zwölf Workshops pro Jahr). Zu Beginn setzen Doktoranden einen individuellen Trainingsplan auf, der den Ausbildungsbedarf für ihr Projekt spezifiziert.

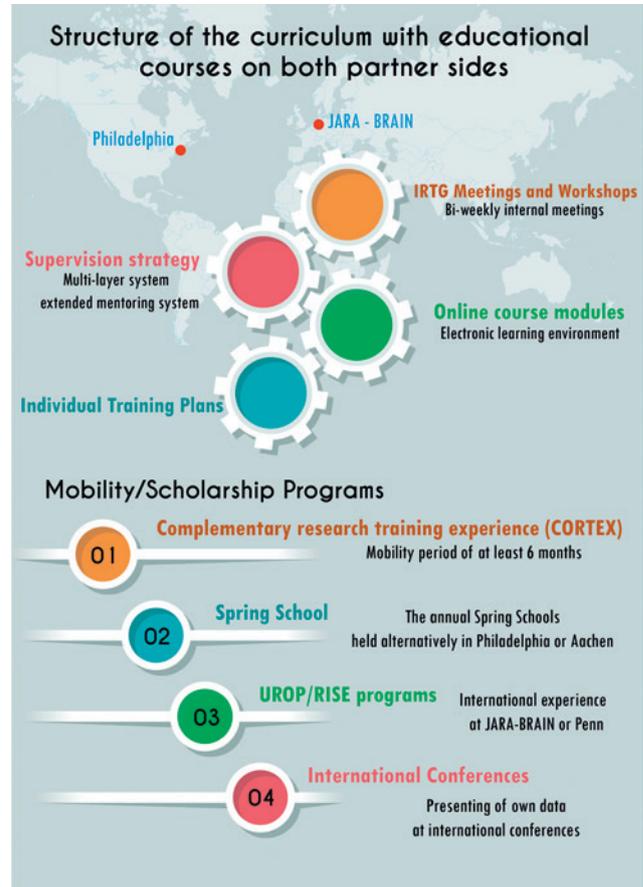


Abb. 2: Struktur des Curriculums mit Trainingseinheiten auf Seiten beider Partner

In Absprache mit den beiden Supervisoren werden hier in Abhängigkeit vom disziplinären Hintergrund zusätzliche (externe) Trainings und somit eine optimale Passung zwischen den Kenntnissen des Doktoranden und den Erfordernissen des Projektes ermöglicht. Aufgrund der klinischen Ausrichtung der Forschungsthematik ist für Doktoranden aus klinikfernen Fachdisziplinen (Biologie, Informatik, Physik, Ingenieurwesen) ein klinisches Praktikum von zwei Wochen auf einer psychiatrischen Station innerhalb der ersten drei Monate der Doktorandenzeit obligatorisch. Dies gewährleistet, dass die Doktoranden Einblicke in die klinische Symptomatik und einen Eindruck von pathologischer Aggression im Rahmen psychischer Störungen erhalten.

Im Rahmen der Forschungsausbildung haben wir einen Review Writing Kurs nach dem Modell der University of Pennsylvania etabliert, in dem jeder Doktorand in den ersten Monaten einen Überblicksartikel zu seiner Thematik verfasst. Dies wird in einem zweiwöchentlich stattfindenden Kurs begleitet und von den Postdocs supervidiert. Die Doktoranden üben dadurch nicht nur Literaturrecher-

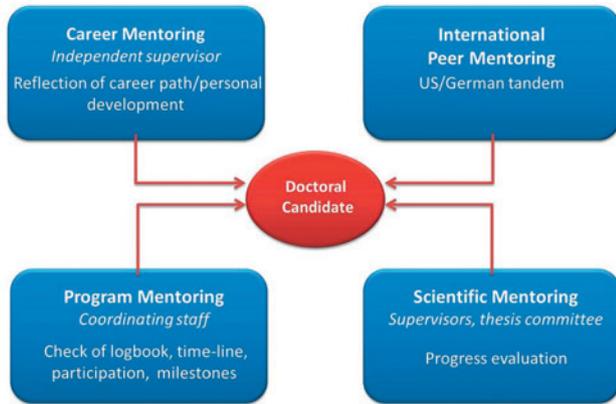


Abb. 3: Mentoring System auf verschiedenen Ebenen

che, Aufbau eines Artikels und das wissenschaftliche Schreiben an sich, sondern auch den Umgang mit Journalen, Editoren und dem Prozess der Veröffentlichung. Zudem erarbeiten sie sich auch die Literatur und die theoretischen Hintergründe ihres Projektes. Sogenannte transferable skills werden in entsprechenden Einheiten der beteiligten Universitäten und Forschungseinrichtungen angeboten. Darüber hinaus können weitere Kurse aus dem generellen universitären Angebot genutzt werden. Ein mehrstufiges Mentorensystem komplettiert das strukturierte Ausbildungsangebot (Abb. 3). Neben der Betreuung durch einen deutschen und einen amerikanischen Supervisor und die deutschen Postdocs werden die Doktoranden auch eng an einen Postdoc/Doktoranden von der University of Pennsylvania angebunden, sodass sie bereits früh auch in die Arbeitsgruppe des amerikanischen Supervisors integriert sind. Der Karrierementor dient als zusätzlicher individueller Berater bei eher formalen und strategischen Überlegungen bezüglich der Karriere und ist vom Doktoranden unabhängig von den IRTG-Supervisoren zu wählen.

Die jährliche Spring School, die alternierend in Aachen/Jülich oder Philadelphia mit ca. 60–70 Teilnehmern stattfindet, vereint die beiden Partnerseiten sowohl auf Doktoranden wie auch auf Supervisorenebene. Hier findet ein intensiver und mehrtägiger wissenschaftlicher Austausch statt, der sowohl Thesis Committee Meetings von Doktoranden und Supervisoren als auch die Projektpräsentationen der Doktoranden und ausgewählte Vorträge interner oder externer Wissenschaftler beinhaltet.

Das Kernstück des IRTGs ist der Auslandsaufenthalt in der Partnerinstitution, der essenzieller Teil der Promotion ist. Für DFG – finanzierte Doktoranden ist ein Aufenthalt zwischen 6 und 12 Monaten in der Arbeitsgruppe des amerikanischen Supervisors obligatorisch. Hier werden

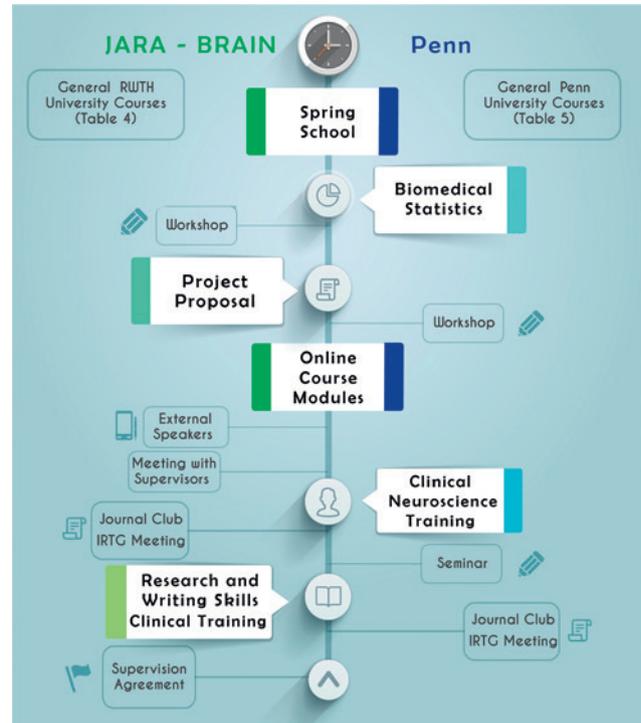


Abb. 4: Exemplarische Darstellung der Ausbildungselemente über die Zeit auf beiden Partnerseiten

komplementäre Erfahrungen im Sinne von erweiterten Methodenkenntnissen gefördert und auch der Einblick in molekulare/zelluläre Forschung für systemische Wissenschaftler (und umgekehrt) ermöglicht. Ziel ist es, eine erweiterte Perspektive zu gewinnen und interdisziplinäre und translationale Forschung durch ein erhöhtes Verständnis für andere Ansätze zu fördern.

Eine gemeinsame Betreuungsvereinbarung der Doktoranden und Supervisoren enthält die Ziele und Verpflichtungen im Rahmen der Promotionszeit und sichert eine geregelte Betreuung. Ein sogenanntes Logbuch dokumentiert die besuchten Veranstaltungen, Workshops, Konferenzen sowie Treffen mit den Supervisoren. Dies dient dem Monitoring der gesetzten Ziele und sichert eine gegenseitige Verbindlichkeit. Ferner prüfen mindestens zwei bis drei Projektpräsentationen in den internen Meetings und Spring Schools sowie das Thesis Committee mit den Supervisoren und einer weiteren neutralen dritten Person (aus den Reihen der Postdocs) den Fortschritt des Doktoranden. In den Thesis Committee Meetings erfolgt zudem eine nach standardisierten Kriterien durchgeführte Bewertung der Doktoranden durch die Supervisoren.

Das IRTG bietet somit ein exzellentes, wissenschaftlich produktives und interdisziplinäres Umfeld für die Ausbildung junger Nachwuchswissenschaftler auf dem

Gebiet der klinischen und translationalen Neurowissenschaften.

Sprecherin und Antragstellerin des IRTG auf deutscher Seite ist Ute Habel. Die Sprecherfunktion auf US-amerikanischer Seite übernimmt Ruben C. Gur.

Dieser Artikel hat Ihnen einen kompakten Einblick in die Forschungs- und Qualifizierungsbestrebungen des neuen internationalen GRK 2150 an den Standorten Jülich-Aachen und Philadelphia, USA vermittelt.

Sie möchten mehr über die Forschungsaktivitäten und Organisationsstruktur des DFG-Graduiertenkollegs 2150 erfahren und / oder die neuesten Forschungsentwicklungen unmittelbar miterleben? Dann sind Sie auf der Website des IRTG herzlich willkommen: <http://www.irtg2150.rwth-aachen.de/>.

Beteiligte JARA BRAIN Wissenschaftler (RWTH Aachen/FZ Jülich)

- D. Bzdok**, Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik, Uniklinik RWTH Aachen
- D. Feldmeyer**, INM-2, JARA-Institut Molekulare Organisation des Gehirns, FZ Jülich; Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik, Uniklinik RWTH Aachen
- B. Herpertz-Dahlmann**, Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik des Kindes- und Jugendalters, Uniklinik RWTH Aachen
- K. Konrad**, Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik des Kindes- und Jugendalters, Uniklinik RWTH Aachen
- K. Mathiak**, Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik, Uniklinik RWTH Aachen
- D. Merhof**, Lehrstuhl für Bildverarbeitung, Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik, RWTH Aachen University
- T. Nickl-Jockschat**, Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik, Uniklinik RWTH Aachen (jetzt: University of Iowa, Department of Psychiatry & Institute of Neuroscience)
- K. Reetz**, Klinik für Neurologie, Uniklinik RWTH Aachen; INM-11, JARA-Institut Molecular Neuroscience and Neuroimaging, FZ Jülich
- F. Schneider**, Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik, Uniklinik RWTH Aachen; INM-10, JARA-Institut Brain Structure-Function Relationships, FZ Jülich
- N. J. Shah**, INM-4/-11, JARA-Institut Physik der Medizinischen Bildgebung/ Molecular Neuroscience and Neuroimaging, FZ Jülich; Klinik für Neurologie, Uniklinik RWTH Aachen
- M. Spehr**, Lehrstuhl für Chemosensorik, Fachgruppe Biologie, Fakultät für Mathematik, Information und Naturwissenschaften, RWTH Aachen University



Abb. 5: April 2017 – Erste Spring School des IRTG 2150

Wissenschaftler der University of Pennsylvania

- T. Abel**, Department of Biology (now University of Iowa)
- D. Bassett**, Department of Bioengineering
- J. Blendy**, Department of Pharmacology, Perelman School of Medicine
- J. Edgar**, Department of Radiology, Children's Hospital of Philadelphia
- S. Jaffee**, Department of Psychology
- R. E. Gur**, Department of Psychiatry
- H. Hakonarson**, Center for Applied Genomics, The Children's Hospital of Philadelphia
- R.H. Hamilton**, Department of Neurology
- J. Kable**, Department of Psychology
- A. Raine**, Department of Criminology, Psychiatry and Psychology
- T. Satterthwaite**, Department of Psychiatry
- S. Siegel**, Department of Psychiatry (now University of Southern California, Los Angeles)
- B. Turetsky**, Department of Psychiatry

Literatur

- American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). (Arlington, VA: American Psychiatric Publishing).
- Anderson, C. A. and Bushman, B. J. (2002). Human aggression. *Annu. Rev. Psychol.* 53, 27–51
- Elbert, T., Moran, J. and Schauer, M. (2017). Lust an Gewalt: appetitive Aggression als Teil der menschlichen Natur. *Neuroforum* 23, 96–104.
- Haller, J. and Kruk, M. R. (2006). Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30(3), 292–303.
- Nelson, R.J. and Trainor, B.C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nat. Rev. Neurosci.* 8(7), 536–546.

Yang, Y. and Raine, A. (2009). Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: A meta-analysis. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 174, 81–88.

Abkürzungen

5-HTT, 5-Hydroxytryptamintransporter
ACC, Anteriorer Cingulärer Cortex
ADHS, Aufmerksamkeits-/Hyperaktivitätsstörung
BDNF, Brain-derived neurotrophic factor
COMT, Catechol-O-Methyltransferase
DLPFC, dorsolateraler Präfrontalkortex
FZ Jülich, Forschungszentrum Jülich
GRK, Graduiertenkolleg
INM, Institut für Neurowissenschaften und Medizin
IRTG, International Research Training Group
JARA, Jülich Aachen Research Alliance
MAOA, Monoaminoxidase
MPFC, medialer Präfrontalkortex
OFC, orbitofrontaler Präfrontalkortex
RWTH Aachen, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
VLPFC, ventrolateraler Präfrontalkortex

Autoreninformationen



Univ.-Prof. Dr. Ute Habel
 1. Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik, Medizinische Fakultät, RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen, Germany, 2. JARA – Translational Brain Medicine, Aachen
 E-Mail: uhabel@ukaachen.de
 Institut für Neurowissenschaften und Medizin, INM 10: JARA Institute Brain Structure Function Relationship, Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich

Web: <https://www.ukaachen.de/kliniken-institute/klinik-fuer-psychiatrie-psychotherapie-und-psychosomatik/team/habel-ute.html>; <http://www.jara.org/de/forschung/jara-brain/personen/mitglieder>

Univ.-Prof. Dr. Ute Habel ist seit 2008 Inhaberin der W3-Professur für Neuropsychologische Geschlechterforschung und Leiterin der Sektion Neuropsychologie an der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik der RWTH Aachen University. Seit 2016 ist sie außerdem eine von drei Direktoren des neugegründeten INM-10, JARA-Instituts „Brain Structure-Function Relationships“, das im Hirnforschungsverbund von der RWTH Aachen und dem FZ Jülich betrieben wird.

Kurzvita: Univ.-Prof. Dr. Ute Habel (*1969 in Temeschburg) begann ihre akademische Vita mit dem Studium der Psychologie in Trier und Tübingen (Diplomabschluss 1995) mit anschließender Promotion an der Universität Tübingen zum Thema „Funktionelle

Kernspintomographie von Emotionen schizophrener Patienten“ (Promotionstitel Dr. rer. soc. 1998). 2005 erlangte sie ihre Habilitation an der Fakultät für Psychologie der Universität Wien für ihre Forschungsarbeiten zum Thema „Neurobiologische Grundlagen von Emotionen und ihren Dysfunktionen“. 2004 erfolgte die Approbation zur psychologischen Psychotherapeutin mit Vertiefung Verhaltenstherapie.

Wissenschaftliche Erfahrungen sammelte sie an der Uniklinik für Psychiatrie und Psychotherapie in Tübingen (1995–1996), am Institut für Medizin am FZ Jülich (1996–1997) und in der Klinik für Psychiatrie an der HHU Düsseldorf (1998–2004). In Österreich forschte sie am Kompetenzzentrum für Hochfeld-MR an der medizinischen Universität Wien (2002–2005).

Seit 2005 ist sie an der Uniklinik der RWTH Aachen leitende Psychologin der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik. 2008 erhielt sie den Ruf auf die W3-Professur „Neuropsychologische Geschlechterforschung“, seither folgten weitere Rufe an andere Universitäten (2007 W2 Universität Würzburg, 2013 W3 Universität Göttingen, 2017 W3 Universität Dresden).

Über ihr Lehr- und Forschungsgebiet hinaus engagiert sie sich im RWTH Strategierat und unterstützt als Rektoratsbeauftragte für die Länder USA und Kanada die internationalen Beziehungen der RWTH.



Prof. Ruben C. Gur, Ph.D

Departments of Psychiatry, Radiology and Neurology, Brain Behavior Laboratory and Center for Neuroimaging in Psychiatry, 3400 Spruce Street, School of Medicine University of Pennsylvania and the Philadelphia Veterans Administration Medical Center, Philadelphia, PA 19104

E-Mail: gur@upenn.edu

Prof. Ruben C. Gur, Ph.D. ist Professor für „Psychologie in der Psychiatrie“ an den Kliniken Psychiatrie, Radiologie und Neurologie der Perelman School of Medicine der University of Pennsylvania (Philadelphia, USA) sowie Leiter der Neuropsychologie und des „Brain Behavior Laboratory“ der Klinik für Psychiatrie. In Forschung und Lehre widmet er sich insbesondere der Untersuchung des menschlichen Gehirns und Verhaltens im gesunden und psychopathologischen Bereich. Unter Einsatz multimethodaler Verfahren soll neues Wissen über die Ätiologie und Behandlungsmöglichkeit komplexer Hirnstörungen wie beispielsweise Schizophrenie generiert werden. Ein besonderer Schwerpunkt liegt außerdem auf der Entwicklung neuer Verfahren für die sog. „Tiefen-Phänotypisierung“ (engl. „deep phenotyping“) von Hirn- und Verhaltensparametern. Im Rahmen breit-angelegter Multicenter-Studien werden klinische und neurokognitive Messungen mit bildgebenden und genetischen Daten kombiniert.

Kurzvita: Prof. Dr. Ruben C. Gur studierte Psychologie und Philosophie an der Hebräischen Universität von Jerusalem (1970 Bachelor of Arts, B. A.), anschließend Psychologie an der Michigan State University (1971 Master of Arts, M. A.). Seine Promotion schloss er 1973 im Bereich der klinischen Psychologie ab (PhD). Als Stipendiat und Postdoktorand forschte er zunächst an der renommierten Stanford University in Kalifornien. 1974 nahm er die Assistenzprofessur an der University of Pennsylvania auf. Anfang der 1980er Jahre begründete er mit seiner Ehefrau Prof. Raquel Gur die Sektion Neuropsychiatrie, eines der ersten und renommiertesten Schizophrenieforschungszentren der Region.

Internationale Zusammenarbeit

Institutsvorstellungen

Dr. Jan Nissen*, Dr. Ruth Narmann* und
PD Dr. Andreas Clausing*



Leopoldina
Nationale Akademie
der Wissenschaften

Leopoldina fördert die neurowissenschaftliche Kooperation auf internationaler Ebene

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-0035>

Zusammenfassung: Die Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina engagiert sich auch im Bereich der Neurowissenschaften. Insbesondere im internationalen Austausch ist dieses Fachgebiet ein gefragtes Themenfeld: Beispiele hierfür sind die regelmäßig durchgeführten bilateralen Symposien mit israelischen und indischen Partnern, die unter der gemeinsamen wissenschaftlichen Federführung von Mitgliedern der Leopoldina und der jeweiligen Partnerakademie entstehen und die im Folgenden kurz vorgestellt werden. Außerdem unterstützt die Leopoldina junge Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler bei ihrem weiteren Werdegang mit einem eigenen Stipendienprogramm, mit dem auch immer wieder Neurowissenschaftlerinnen und -wissenschaftler gefördert werden.

Schlüsselwörter: Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina; Neurowissenschaften; Stipendienprogramm; Israel; Indien

Einleitung

Die neurowissenschaftliche Forschung in Deutschland verfügt über ein weitgespanntes Netz an internationalen Kontakten und Kooperationen. Die Leopoldina ist als Nationale Akademie die Stimme der deutschen Wissenschaft im internationalen Akademien-Dialog sowie in der glo-

balen wissenschaftsbasierten Beratung von Politik und Öffentlichkeit. Mit hochkarätig besetzten Symposien, Vorträgen und Stipendienprogrammen fördert sie die wissenschaftliche Zusammenarbeit auf internationaler Ebene und bindet dabei Mitglieder und externe Experten in vielfältiger Weise ein – unter anderem auch auf dem Gebiet der Neurowissenschaften. Zu den Mitgliedern der Leopoldina zählen aktuell ca. 1.500 Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler aus dem In- und Ausland. Davon gehören 113 Mitglieder den Sektionen „Neurowissenschaften“ und „Psychologie und Kognitionswissenschaften“ an.

Die Leopoldina kooperiert auf dem Gebiet der Neurowissenschaften insbesondere mit Wissenschaftsakademien in Israel und Indien. Die Förderung des wissenschaftlichen Austauschs und der bilateralen Vernetzung stehen im Fokus dieser Aktivitäten. Seit 2008 organisierten Mitglieder der Leopoldina und der Israel Academy of Sciences and Humanities (Israel Academy) fünf neurowissenschaftliche Symposien. Dabei befassten sich die beteiligten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler mit Forschungsthemen wie mikrobieller Pathogenese, neurodegenerativen Erkrankungen und der Funktion von Nervenzellen und Synapsen. Das sechste Symposium wird im Mai 2018 in Berlin ausgerichtet. Die Leopoldina und die Israel Academy unterzeichneten 2013 ein Partnerschaftsabkommen, um ihre Zusammenarbeit langfristig zu vertiefen. Hiervon profitiert auch die neurowissenschaftliche Tagungsreihe, die inzwischen ein fester Bestandteil der deutsch-israelischen Akademienkooperation ist.

Mit der Indian National Science Academy (INSA) arbeitet die Leopoldina im Rahmen eines Kooperationsabkommens bereits seit 2007 eng zusammen. Seit 2015 liegt bei den gemeinsamen Symposien in Indien und Deutschland der thematische Schwerpunkt auf den Neurowissenschaften. Dieses Gebiet wird in Indien zwar auf hohem Niveau, aber noch nicht in verbreitetem Umfang bearbeitet, doch besteht bei Forschern und Nachwuchswissenschaftlern großes Interesse und die Community wächst stetig. Zentren wie das National Brain Research Centre (NBRC) in

*Korrespondenzautoren: Jan Nissen, Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina, Jägerberg 1, 06108 Halle (Saale), E-Mail: Jan.Nissen@leopoldina.org

Ruth Narmann, Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina, Jägerberg 1, 06108 Halle (Saale), E-Mail: Ruth.Narmann@leopoldina.org

Andreas Clausing, Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina, Jägerberg 1, 06108 Halle (Saale), E-Mail: Andreas.Clausing@leopoldina.org

der Nähe von Delhi spielen dabei eine wichtige Rolle. 2015 lag der Schwerpunkt bei einem interdisziplinären Symposium in Hyderabad auf dem Zusammenhang von Gehirn und Sprache. 2016 diskutierten Vertreter der Psychologie, der Genetik, der Neurobiologie sowie der computergetriebenen Neurowissenschaften in Hyderabad das „Sehen“ als eine der komplexesten Sinneswahrnehmungen. Im Spätherbst 2017 wird die Reihe in Hyderabad fortgesetzt, dann zum Thema „The Challenge to Learn: New Approaches to Study the Problem of Stability vs. Stability in the Brain“. Längerfristiges Ziel der Aktivitäten von Leopoldina und INSA ist die Wegbereitung für eine deutsch-indische Plattform „Neurowissenschaften“.

Die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses ist der Leopoldina ein besonderes Anliegen. So lädt sie zu ihren neurowissenschaftlichen Symposien Nachwuchswissenschaftlerinnen und -wissenschaftler ein, die in Poster-Sessions, Vorträgen und Diskussionsrunden ihre Forschung präsentieren und mit bekannten Experten diskutieren können. Die Neurowissenschaftliche Gesellschaft fördert seit 2015 mit einem Stipendienprogramm die Teilnahme deutscher Nachwuchswissenschaftler an der neurowissenschaftlichen Tagungsreihe der Leopoldina und der Israel Academy. Die Leopoldina ermöglicht jungen Neurowissenschaftlerinnen und -wissenschaftlern darüber hinaus mit eigenen Stipendienprogrammen Aufenthalte an renommierten Forschungsinstitutionen im Ausland (siehe Exkurs).

Exkurs

Das **Leopoldina-Förderprogramm** bildet seit dem Jahr 1991 eine zentrale Position der Nachwuchsförderung der Akademie. Gefördert werden junge Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler, die mit Aufenthalten an den fachspezifisch renommiertesten Forschungsstätten im Ausland die eigene Spezialisierung und Profilierung im akademischen Werdegang vorantreiben möchten. Bewerber können sich exzellente Personen nach der Promotion, die dann individuell unterstützt und weiter qualifiziert werden und die die kommende Generation in Forschung und Lehre in Deutschland darstellen können [<http://www.leopoldina.org/de/foerderung/das-leopoldina-foerderprogramm/>]. Mehr als 475 Personen konnten bisher von der Leopoldina unterstützt werden, über 360 Personen seit 1997 mit einer Postdoc-Förderung.

Besucht werden weltweit renommierte Forschungsstätten und Gastgeber. Die Hauptziele für die Auslandsaufenthalte liegen in den USA und Kanada, gefolgt von

Aufenthalten überwiegend in EU-Staaten, am häufigsten in Großbritannien, sowie der Schweiz. Regelmäßig liegen Anträge aus den Bereichen Neurobiologie, Neuropsychologie und Kognitionswissenschaften vor. Der Erfolg der Förderung zeigt sich vor allem an der Berufung Ehemaliger auf Lehrstühle und Professuren:

Professorin Dr. Laura Busse war als Postdoc am Smith-Kettlewell Eye Research Institute in San Francisco in Kalifornien tätig. Sie kam nach der Rückkehr zunächst an die Universität Tübingen und arbeitet nun an der LMU München (Systems Neurobiology).

Professorin Dr. Daniela C. Dieterich forschte am Caltech und Howard Hughes Medical Institute in Pasadena in Kalifornien. In Magdeburg arbeitete sie am Leibniz-Institut für Neurobiologie und wurde dann an das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität berufen.

Professorin Dr. Nadja Freund besuchte für die Postdoc-Phase die Harvard Medical School und kehrte dann an die Universität Tübingen zurück. 2016 wurde sie Juniorprofessorin an der Ruhr-Universität Bochum für den Forschungsbereich Psychoneuroimmunologie.

Professor Dr. Tobias Donner war an der New York University als Stipendiat beschäftigt, danach als Assistent Professor an der Universität Amsterdam und folgte dann dem Ruf an das Uniklinikum Hamburg-Eppendorf in das Institut für Neurophysiologie und Pathophysiologie.

Professor Dr. Robert Kumsta ging an das Institute of Psychiatry des King's College in London und an die School of Psychology der Universität Southampton. Er habilitierte sich an der Universität Freiburg und wurde an die Universität Bochum für den Schwerpunkt Genetic Psychology berufen.

Professor Dr. Andreas Schäfer wählte das University College in London für sein Postdoc-Projekt und arbeitete anschließend als Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg. Zurück in London ist er Professor am University College sowie Projektleiter am Francis Crick Institut.

Autoreninformationen



Dr. Jan Nissen
Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina, Jägerberg 1,
06108 Halle (Saale)
E-Mail: Jan.Nissen@leopoldina.org

Dr. Jan Nissen ist Referent in der Abteilung Internationale Beziehungen der Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina.



Dr. Ruth Narmann
Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina, Jägerberg 1,
06108 Halle (Saale)
E-Mail: Ruth.Narmann@leopoldina.org

Dr. Ruth Narmann ist stellvertretende Leiterin der Abteilung Internationale Beziehungen der Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina.



PD Dr. Andreas Clausing
Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina, Jägerberg 1,
06108 Halle (Saale)
E-Mail: Andreas.Clausing@leopoldina.org

PD Dr. Andreas Clausing ist Koordinator des Förderprogramms der Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina.

Rezension

Steve Ayan: *Rätsel Mensch – Expeditionen im Grenzbereich von Philosophie und Hirnforschung*

Besprochen von **C. G. Galizia**, Institut für Neurobiologie, Universität Konstanz, 78457 Konstanz, Deutschland.

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-0004>



Im letzten Jahrhundert hat der damalige amerikanische Präsident die 90er Jahre zur „decade of the brain“ aufgerufen – Hirnforschung wurde gefördert und in der breiten Öffentlichkeit präsentiert.

Dieses goldene Jahrzehnt hat Früchte getragen: Die Neurowissenschaften wurden von vielen als die neue Leitwissenschaft angepriesen (wobei mir scheint, dass die Neurowissenschaftler und Neurowissenschaftlerinnen selber mit diesem Begriff eher Schwierigkeiten hatten). Forschungsmittel haben zugenommen und auch das öffentliche Interesse. Der Diskurs über die Neurowissenschaften wuchs über die Fachgrenzen hinaus, sowohl über die nahen Grenzen, die heute kaum noch als Grenzen zu erkennen sind (etwa zur Psychologie), als auch über weiter entfernte. Insbesondere die Philosophie, deren Überlappung mit den Neurowissenschaften früher allein in der Erkenntnistheorie und Wissenschaftsphilosophie zu suchen war, beschäftigt sich inzwischen stark mit den Begriffen der Hirnforschung, eine Beschäftigung, die bis in die Definition einzelner Begriffe hineingeht. Im Oktober 2004 haben elf Neurowissenschaftler „Das Manifest“ in der Zeitschrift „Gehirn & Geist“ veröffentlicht, unter ihnen Gerhard Roth, Hannah Monyer, Heiko Luhmann, Angela Friederici und Randolph Menzel. Eine Bestandesaufnahme der damaligen Zeit und eine Projektion in die Zukunft, was noch von der Neurowissenschaft zu erwarten sei. „Das Manifest“ hat in der öffentlichen Diskussion Furore gemacht:

Die Feuilletons der Zeitungen haben über lange Zeit dieses Thema als wiederkehrende Diskussion aufgegriffen – mit Urteilen von „Meisterwerk“ bis zu „Anmaßung“ war alles dabei. Die Neurowissenschaften waren mitten in der Gesellschaft angekommen, und quer zu den Disziplinen präsent. Der Zeitschrift „Gehirn und Geist“ ist es damit gelungen, sich stark in dieser Diskussion zu positionieren.

Tatsächlich hatte die Zeitschrift schon seit ihrer ersten Ausgabe 2002 immer wieder den Grenzbereich zwischen den Disziplinen thematisiert und insbesondere auch philosophische Fragen aufgegriffen. Was ist Bewusstsein? Wie steht es mit dem freien Willen? Sprache? Moral? Tierversuche? Diese Beiträge sind nun in einem redigierten Sammelband erschienen: 45 kurze Artikel aus der Soziologie, der Psychologie, der Philosophie, von Wissenschaftlern oder Fachjournalisten geschrieben. Die Themen sind breit gefächert: Julian Nida-Rümelin fragt „Was ist gerecht?“, John Searle gibt ein Interview und liefert die Erkenntnis „Wir sind biologische Apparate“, Joachim Retzbach befasst sich mit Neuroenhancement, Jan Slaby spricht in „Ein Organ allein denkt nicht“ über die Konflikte zwischen Neurowissenschaften und Philosophie. Katrin Amundts und Gerhart Roth überlegen, was aus dem „Manifest“ geworden ist, und ziehen das Fazit: viele Kontroversen seien durch überspitztes Lesen des Textes entstanden, der Text selber sei demgegenüber eher zahm gewesen. Schade, dass „Das Manifest“ selber nicht in den Sammelband aufgenommen wurde – vielleicht wäre das eine Anregung für die nächste Auflage. Übersichtsartikel zu den neurowissenschaftlichen Grundlagen sind oft von Wissenschaftsjournalisten verfasst – es fällt auf, dass die Neurowissenschaftler selber kaum zu Wort kommen, und wenn, dann eher in einer Metaebene, also bei der Reflektion über die Diskussion zu den Themen, die durch die Forschung aufgeworfen und in den Medien aufgegriffen werden. Beiträge zu der (eigenen) neurowissenschaftlichen Forschung wären da willkommen gewesen.

Der Herausgeber und Redakteur von Gehirn und Geist, Steve Ayan, hat die Artikel redigiert und in drei große Bereiche gegliedert: Sprache und Denken, Bewusstsein und Willensfreiheit, Gut und Böse. In „Sprache und Denken“ lesen wir über „das Denken“ an sich (inklusive Ratgeber: 10 Tipps um besser zu denken). Christian Wolf, Philosoph in Berlin, betrachtet die Sprache der Hirnforscher und attestiert ihr, eine Mischung aus Fachjargon und Alltagssprache zu sein. Das geht z. T. in Richtung „Wortpolizei“ – also der Forderung, dass Hirnforscher bestimmte Begriffe nicht nutzen sollten (so sollte man nicht davon sprechen, dass das Gehirn „Informationen verarbeitet“, weil damit

die Assoziation an einen Computer geweckt wird). Das mag übertrieben sein, aber die Feststellung, dass sprachliche Begriffe das Denken beeinflussen, ist richtig – denn die Wörter führen zu Assoziationen, die Fragen aufwerfen. Er zitiert Bennett und Hacker: Wenn man (bildlich gesprochen) vom Fuß eines Berges spricht, dann benutzt man eine Metapher. Diese wird zu einem Problem, wenn man nach dem Schuh des Berges sucht – was aber durchaus passieren kann, wenn man sich von der Metapher nicht lösen kann. Allein, am Ende wird das Kind mit dem Bade ausgeschüttet, wenn nicht nur die Begriffe, sondern auch die Erkenntnisse der Neurowissenschaften abgelehnt werden. In der Gesamtschau der Artikel bin ich mir letztlich nicht sicher, ob die Kritik und die Missverständnisse, die in den Beiträgen aus der Philosophie erscheinen, nicht darauf beruhen, dass die neurowissenschaftliche Originalliteratur nicht als Quelle verwendet wird, sondern die Sekundärliteratur. Der „Hype“ mit seinen Überbewertungen entsteht vielleicht stufenweise, vom Artikel, über den „News and Views“, zur Tageszeitung. Auch aus diesem Blickwinkel ist das hier rezensierte Buch interessant: Ich erfahre, wie die Neurowissenschaft und deren Begriffe durch den Bezug auf die Sekundärliteratur (die notwendigerweise oberflächlich ist) missverstanden werden und überlege, ob mir das vielleicht in die andere Richtung gerade auch passiert, wenn ich in dem Buch die Beiträge der Philosophen lese, die ihre Sprache für ein breiteres Publikum vereinfacht haben? Solche Perspektivwechsel erzeugen bei der Lektüre so manche erfrischende Einsicht. Der Band enthält einen Artikel mit „9 Ideen für eine bessere Neurowissenschaft“, die nach mehr Transparenz, strengeren Qualitätskriterien, bis hin zu „wir brauchen eine umfassende Theorie des Gehirns“ reichen. Am

Ende des Buches wird in mehreren Artikeln die Problematik der Tierversuche aufgegriffen – inklusive eines Streitgesprächs zwischen dem Philosophen Klaus Peter Rippe (der, wenn ein Hund und ein Mensch am ertrinken sind, je nach Situation auch den Hund als erstes retten würde), und Wolf Singer (der in der menschlichen Fähigkeit, Kathedralen zu bauen, einen kategorialen Unterschied zu den Tieren sieht).

Zusammenfassend kann man sagen, dass dies ein spannender Sammelband ist, vor allem, weil Fragen zusammengestellt wurden, die aktuell diskutiert werden, und durch die vielfältigen Blickwinkel die Widersprüche in den Diskussionen erkennbar werden. Von Tierversuchen, über freien Willen, zur Sprachregelung und den Begrifflichkeiten – bei der Lektüre der Beiträge versteht man, warum diese Themen spannend sind und warum wir uns so oft missverstehen. Als Neurowissenschaftler lernen wir in dem Buch nicht viel Neues über das Gehirn, aber viel darüber, wie wir von anderen Disziplinen, insbesondere von der Philosophie aus, gesehen werden – und dass der Dialog vertieft werden muss. Als Laie lernt man aber doch einiges über das (menschliche) Gehirn, über die Faszination, nach den Mechanismen des Denkens zu suchen, und über die Komplexität des Nervensystems: Es gibt noch viel zu erforschen.

Steve Ayan (Hrsg.): *Rätsel Mensch – Expeditionen im Grenzbereich von Philosophie und Hirnforschung.*

Springer, Heidelberg: 2017, 353 Seiten

ISBN: 978-3-662-50326-3 (Softcover)

19,99 €

ISBN: 978-3-662-50327-0 (eBook)

14,99 €

Nachruf

Thomas Deller*, Robert Nitsch* und Gaby Rune*

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Frotscher

Gründungsmitglied und 1. Präsident der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft

<https://doi.org/10.1515/nf-2017-0033>

Am 27. Mai 2017 ist Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Frotscher im Alter von nur 69 Jahren plötzlich und unerwartet verstorben. Michael Frotscher wurde am 3. Juli 1947 in Dresden geboren. Er studierte Medizin an der Humboldt-Universität zu Berlin und war nach seiner Promotion im Jahr 1973 von 1974 bis 1979 als Assistent am Institut für Anatomie beschäftigt. Während dieser Zeit verbrachte er Forschungs- und Arbeitsaufenthalte an der Semmelweis-Universität in Budapest, wo er in Kontakt mit János Szentágothai und Wissenschaftlern der ungarischen Schule der Neuroanatomie und Neurowissenschaften kam. Diese Zeit prägte ihn und war verbunden mit der Einsicht, dass neurale Strukturen und ihre Funktionen eine untrennbare Einheit bilden.

Michael Frotscher flüchtete 1979 aus der DDR, um seinen Forschungen in Freiheit nachgehen zu können. Nach seiner Flucht arbeitete er zunächst am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main, wo ihm die Goethe-Universität Frankfurt am Main 1981 die *Venia legendi* für das Fach Anatomie verlieh. Nach einer kurzen Zeit als C2-Professor in Heidelberg übernahm er 1983 eine C3-Professur an der Dr. Senckenbergischen Anatomie in Frankfurt am Main. In dieser Zeit ging er mehrfach zu Forschungsaufenthalten an die Yale Universität. Von 1989 bis 2011 war er Direktor der Abteilung für Neuroanatomie des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Ab 2011 leitete Michael Frotscher das Institut für Strukturelle Neurobiologie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) des

Universitätsklinikums Eppendorf. 2015 wurde er Direktor des Zentrums.

Michael Frotscher war Wissenschaftler aus Berufung. Er war fasziniert von der engen Beziehung, die zwischen neuronalen Strukturen und ihren Funktionen besteht. Diese Struktur-Funktions-Zusammenhänge untersuchte er vorwiegend in der Hippokampusformation, die für ihn aufgrund ihrer klaren Strukturen, Konnektivität und ihrer Relevanz für Lernen und Gedächtnis einen besonderen Reiz ausübte. Er fragte sich insbesondere, wie Entwicklungsprozesse zu einer derart geschichteten Hirnstruktur führen können (Frotscher und Heimrich, 1993; Förster et al., 2006) und untersuchte die entwicklungsgeschichtliche Bedeutung von Cajal-Retzius-Zellen und Reelin (Del Rio et al., 1997; Förster et al., 2002; Frotscher, 2010; Chai et al., 2016). Ein zweiter wissenschaftlicher Schwerpunkt war die strukturelle Plastizität reifer Synapsen. Die Fähigkeit von Synapsen zu strukturellen Veränderungen war erst in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts experimentell bewiesen worden und Michael Frotscher war begeistert davon, dass – anders als Ramon y Cajal zunächst vermutet hatte – Synapsen im Nervensystem durchaus zur Veränderung und sogar zur Neubildung in der Lage sind. So interessierte er sich für die strukturellen und funktionellen Veränderungen von Synapsen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen und nutzte dabei modernste zellbiologische Methoden (Markram et al., 1997; Vida und Frotscher, 2000; Deller et al., 2003; Kretz et al., 2004; Guzman et al., 2016). Obwohl sein Hauptaugenmerk der Grundlagenforschung galt, behielt er auch im Auge, dass seine Forschungen dazu beitragen können, Reparaturmechanismen im Nervensystem zu verstehen und untersuchte die Reorganisation des Gehirns nach einer Schädigung (Nitsch und Frotscher, 1992; Frotscher et al., 1997) und strukturelle Veränderungen im Hippokampus von Epilepsiepatienten (Haas et al., 2002). Mit dem Wechsel an das ZMNH in Hamburg kehrte Michael Frotscher methodisch zur Elektronenmikroskopie zurück, mit der er bereits als junger Doktorand seine Karriere begonnen hatte. Mittels Kryosubstitution und postembedding Immunogold-Verfahren klärte er die molekulare Anatomie hippokampaler

Korrespondenzautoren: Thomas Deller, Institut für Klinische Neuroanatomie, Dr. Senckenbergische Anatomie, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt/Main, Deutschland, E-Mail: t.deller@em.uni-frankfurt.de

Robert Nitsch, CEO/Medical Director, University Medical Center Münster, Albert-Schweitzer-Campus 1, Bldg. D 5, 48149 Münster, Deutschland, E-Mail: robert.nitsch@ukmuenster.de

Gaby Rune, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Gebäude N61, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Deutschland, E-Mail: rune@uke.de

Synapsen mit einer bislang nicht gesehenen Qualität und Genauigkeit auf (Studer et al., 2014). Im Mai 2017 war er keinesfalls müde, die Antworten auf seine Fragen zu suchen und er hätte dies mit Begeisterung noch für viele weitere Jahre getan.

Für Michael Frotscher war das wissenschaftliche Umfeld von großer Bedeutung. Er interagierte mit anderen Arbeitsgruppen und forderte interdisziplinäre Arbeit ein. Er gestaltete sein wissenschaftliches Umfeld aktiv und engagierte sich in zahlreichen Forschungskonsortien. Bereits während seiner Zeit in Frankfurt war er Mitglied des SFBs 269 (Molekulare und zelluläre Grundlagen neuronaler Organisationsprozesse). Mit seinem Wechsel nach Freiburg gründete er den SFB 505 (Neuronale Differenzierung und Neurotransmission), dessen Sprecher er bis zum Ende der Förderung 2007 blieb. Er war Mitbegründer des Transregio TR-3 (Mesiale Temporallappen-Epilepsien), des SFB 780 (Synaptische Mechanismen neuronaler Netzwerkfunktion) und der Forschergruppe 2419 (Plastizität versus Stabilität). An seinen Tätigkeitsorten wirkte er konstruktiv gestaltend in sein Umfeld hinein und er wurde für seine integrativen Fähigkeiten sehr geschätzt.

Michael Frotscher war ein inspirierender akademischer Lehrer. Er übte eine starke Faszination auf die Menschen seiner Umgebung aus, die sich von seinen wissenschaftlichen Ideen begeistern ließen. Bemerkenswert war seine Fähigkeit, selbst hochkomplexe Zusammenhänge verständlich, nachvollziehbar und interessant darzustellen. Er wurde für seine Lehrtätigkeiten mehrfach ausgezeichnet und schrieb Standardlehrbücher der Neuroanatomie. Er ließ es sich nicht nehmen, mit der Hauptvorlesung in Neuroanatomie „einen Punkt zu machen“, wie er gerne sagte. Sein Charisma zog eine Reihe von „Schülern“ an, die ihm in die Neurowissenschaften folgten. Dabei hat sein Denken nicht nur seine „Schüler“, sondern noch seine „Enkelgeneration“ geprägt, die als „Schüler“ seiner „Schüler“ bereits akademisch erfolgreich sind. Erst vor einem Jahr wurde ihm von vier „Schülern“ und „Enkeln“ eine gemeinsame Publikation in *Developmental Cell* gewidmet (Liu et al. 2016), die auf dem von Michael Frotscher geprägten Denken über die enge Verknüpfung von Struktur und Funktion neuronaler Systeme basiert. Michael Frotscher freute sich sehr über den Erfolg der „Frotscher-family“; das zeichnete ihn in besonderer Weise aus.

Die Arbeit in akademischen und wissenschaftlichen Gremien war für Michael Frotscher ein Mittel, um die Wissenschaftslandschaft in Deutschland aktiv mit zu gestalten. Er war Gründungsmitglied und erster Präsident der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft (1993), Mitglied (seit 1995) und Senator der Leopoldina und Vorsitzender

der Anatomischen Gesellschaft (1999). Er war in zahlreichen Beiräten tätig und hatte über viele Jahre Funktionen in der Deutschen Forschungsgemeinschaft inne. Dort wirkte er zunächst als Fachgutachter, dann als Mitglied und Vorsitzender des Fachkollegiums Neurowissenschaften, und schließlich als Mitglied des Senatsausschusses für Sonderforschungsbereiche mit. Sein wissenschaftliches Engagement war nicht auf Deutschland begrenzt. So wurde er auch in anderen Ländern als fairer Gutachter und Mitglied zahlreicher internationaler Fachgesellschaften geschätzt. Er war Editor von *Experimental Brain Research* und Mitglied in Editorial Boards hochangesehener Fachzeitschriften, u. a. *Journal of Neuroscience*, *Journal of Comparative Neurology* und *Hippocampus*.

Michael Frotscher erhielt für seine akademischen und wissenschaftlichen Verdienste zahlreiche Preise und Auszeichnungen, darunter den Bargmann-Preis der Anatomischen Gesellschaft (1992), den Gottfried Wilhelm Leibniz-Preis (1993), den Max-Planck-Forschungspreis (2000), den Landesforschungspreis Baden-Württemberg (2001), den Ernst Jung-Preis (2002), sowie die Hertie-Senior-Forschungsprofessur (2007). Im Jahre 2009 wurde er mit der Ehrendoktorwürde der Goethe-Universität Frankfurt am Main ausgezeichnet. Die Wissenschaftsgemeinschaft nahm im Rahmen einer akademischen Trauerfeier in Hamburg am 16.06.2017 von ihm Abschied. Vertreter des UKE Hamburg, Weggefährten und herausragende Vertreter deutscher Wissenschaftsorganisationen würdigten seine zahlreichen Verdienste für die Wissenschaft im Allgemeinen und für die Neurowissenschaften im Speziellen.

Am 01.09.2017 fand am Institut für Neuroanatomie des UKE Hamburg ein Gedächtnissymposium zu Ehren von Michael Frotscher statt. Dieses Symposium, das ursprünglich als Geburtstagssymposium geplant war – Michael Frotscher wäre am 03.07.2017 70 Jahre alt geworden – brachte viele seiner Freunde und Weggefährten zusammen. Michael Frotscher wurde an diesem Tag, ganz so wie er es sich auch für sein Geburtstagssymposium gewünscht hatte, mit ausgezeichneten wissenschaftlichen Vorträgen geehrt. Unter dem Titel „Neurons, Synapses and Circuits Involved in the Processing of Information from the Entorhinal Cortex“ hörten mehr als einhundert Teilnehmer Vorträge zur Funktion von grid cells (Hannah Monyer, Heidelberg; Menno Witter, Trondheim; Michael Brecht, Berlin), kortikalen Netzwerken (Heinz Beck, Bonn; Marlene Bartos, Freiburg; Jörg Geiger, Berlin; Andreas Draguhn, Heidelberg; Jochen Staiger, Göttingen), Mooszellen und Interneuronen (Helen Scharfman, New York; Alexander Drakew, Hamburg; Peter Somogyi, Oxford) und Synapsen (Thomas Oertner, Hamburg; Roger Nicoll, San Francisco; Robert Nitsch, Münster; Johannes Vogt, Mainz;

Thomas Deller, Frankfurt). Dabei wurde offensichtlich, wie vielfältig Michael Frotscher in die nationale und internationale Wissenschaftsgemeinschaft hineingewirkt und die wissenschaftliche Entwicklung von jungen Forschenden beeinflusst und immer wieder ausschlaggebend mitgeprägt hat.

Wir behalten Michael Frotscher als außergewöhnlichen Neurowissenschaftler, Anatomen, Weggefährten, Lehrer und Mentor, Vorbild und guten Freund in Erinnerung. Wir sind dankbar für das, was er uns mit auf unseren Weg gegeben hat, für seine Inspirationen sowie für seine konstruktive Kritik. Seine wissenschaftlichen Entdeckungen und Erkenntnisse, seine wissenschaftliche Schule und die große Zahl der von ihm ausgebildeten Studierenden sind sein bleibendes Vermächtnis. Seine Stimme wird fehlen – auf unseren Tagungen, aber auch und ganz besonders dort, wo er sich in seinen vielfältigen Funktionen engagiert für die Neurowissenschaften einsetzte.

Prof. Dr. Thomas Deller, Frankfurt
 Prof. Dr. Dr. Robert Nitsch, Münster
 Prof. Dr. Gaby Rune, Hamburg
 (in alphabetischer Reihenfolge)

Literatur

- Chai, X., Zhao, S., Fan, L., Zhang, W., Lu, X., Shao, H., Wang, S., Song, L., Failla, A. V., Zobiak, B., Mannherz, H. G. und Frotscher, M. (2016). Reelin and cofilin cooperate during the migration of cortical neurons: a quantitative morphological analysis. *Development* 143: 1029-1040.
- Deller, T.*, Korte, M.*, Chabanis, S.*, Drakew, A., Schwegler, H., Stefani, G. G., Zuniga, A., Schwarz, K., Bonhoeffer, T., Zeller, R.*, Frotscher, M.* und Mundel, P.* (2003). Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 10494-9.
- Del Río, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M.* und Soriano, E.* (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385: 70-74.
- Förster, E., Tielsch, A., Saum, B., Weiss, K. H., Johanssen, C., Graus-Porta, D., Müller, U. und Frotscher, M. (2002). Reelin, Disabled 1, and beta1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 13178-13183.
- Förster, E., Zhao, S. und Frotscher, M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 259-267.
- Frotscher, M. (2010). Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends Neurosci.* 33: 407-414.



Abb. 1: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Frotscher, * 03.07.1947 Dresden, † 27.05.2017 Hamburg (Quelle: Dr. A. Drakew, Prof. Dr. G. Rune, Hamburg)

- Frotscher, M. und Heimrich, B. (1993). Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 10400-10403.
- Frotscher, M., Heimrich, B. und Deller, T. (1997). Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci.* 20: 218-23.
- Guzman, S. J., Schlogl, A., Frotscher, M. und Jonas, P. (2016). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science* 353: 1117-1123.
- Haas, C. A., Dudeck, O., Kirsch, M., Huszka, C., Kann, G., Pollak, S., Zentner, J. und Frotscher, M. (2002). Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 22: 5797-802.
- Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M. und Rune, G. M. (2004). Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J. Neurosci.* 24: 5913-21.
- Liu, X.*, Huai, J.*, Endle, H.*, Schlüter, L., Fan, W., Li, Y., Richers, S., Yurugi, H., Rajalingam, K., Ji, H., Cheng, H., Rister, B., Horta, G., Baumgart, J., Berger, H., Laube, G., Schmitt, U., Schmeisser, M. J., Boeckers, T. M., Tenzer, S., Vlachos, A., Deller, T., Nitsch, R.* und Vogt, J.* (2016). PRG-1 regulates synaptic plasticity via intracellular PP2A/β1-Integrin signaling. *Dev. Cell* 38: 275-290.
- Markram, H., Lübke, J., Frotscher, M. und Sakmann, B. (1997). Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275: 213-215.
- Nitsch, R. und Frotscher, M. (1992). Reduction of posttraumatic transneuronal “early gene” activation and dendritic atrophy by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 5197-200.
- Studer, D., Zhao, S., Chai, X., Jonas, P., Graber, W., Nestel, S. und Frotscher, M. (2014). Capture of activity-induced ultrastructural changes at synapses by high-pressure freezing of brain tissue. *Nat. Protoc.* 9: 1480-1495.
- Vida, I. und Frotscher, M. (2000). A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 1275-1280.

*equal contribution.

Call for Symposia

Symposia dealing with all areas of neuroscience research are invited. The applicant should submit a proposal containing the title of the planned symposium, the name(s) and address(es) of the organizer(s), a short description of the aims of the symposium and the names, addresses and topics of the speakers to be invited. The NWG strives to increase the proportion of women as organizers and speakers of symposia. The gender distribution within each proposal will therefore be one selection criterion. The application must be submitted via the Society's website: <http://nwg.glia.mdc-berlin.de>

Deadline for submission of a symposium proposal: February 15, 2018

Thirteenth Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society

March 20–23, 2019

Stipends:

The German Neuroscience Society will provide stipends for young qualified researchers. Details will be announced at www.nwg-goettingen.de/2019/

The programmes of the

last meetings are available at www.nwg-info.de/meetings/jahrestagung/archive

Program Committee:

Prof. Dr. Eckhard Friauf (Chair)
Prof. Dr. Ansgar Büschges
Prof. Dr. Ricarda Diem
Prof. Dr. Martin Göpfert
Prof. Dr. Benedikt Grothe
Prof. Dr. Matthias Kneussel
Prof. Dr. Hanspeter Mallot
Prof. Dr. Albert Christian Ludolph
Prof. Dr. Angelika Richter
Prof. Dr. Christine Rose
Prof. Dr. Stefan Rotter
Prof. Dr. Christian Steinhäuser
Prof. Dr. Petra Wahle
Prof. Dr. Christian Wegener

Local Organizer:

Prof. Dr. Martin Göpfert
Zelluläre Neurobiologie
Schwann-Schleiden-Forschungszentrum
Julia-Lermontowa-Weg 3
37077 Göttingen
mgoepfe@gwdg.de

Organization:

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V.
Max Delbrueck Center for Molecular Medicine (MDC)
Berlin-Buch
Robert Roessle Str.10
13092 Berlin
Germany
Phone: +49 30 9406 3127
Fax: +49 30 9406 2813
E-Mail: korthals@mdc-berlin.de
Homepage: www.nwg-info.de

Nachrichten



<https://doi.org/10.1515/nf-2017-0054>

Hans-Joachim Pflüger

Göttinger Jahrestagung 2017 – bewährt und beliebt

Nach dem Spiel ist vor dem Spiel: gerade ist die Auswertung und Nachbereitung der Göttinger Tagung 2017 zu einem Abschluss und dem vorliegenden Bericht gelangt, da erscheint zeitgleich schon wieder der Call for Symposia für die nächste Tagung 2019 in derselben Neuroforum-Ausgabe. Das ist aber auch gut so, denn der Bericht kann nur Positives vermelden und motiviert somit hoffentlich zur Beteiligung an der nächsten Tagung, die vom 20. – 23. März 2019 stattfinden wird.

In diesem Jahr hatte die NWG vom 18. – 21. März nach Göttingen eingeladen, zum 12. Mal. In der Liste der Neuro-

biologentagungen, aus denen die Tagung hervorgegangen ist, wäre es die 36ste gewesen. Verglichen mit dem Vorjahr blieb die Teilnehmerzahl stabil, was erfreulich ist, da in der neurowissenschaftlichen Kongresslandschaft eher ein Trend weg von den multidisziplinären hin zu fachspezifischen Meetings zu beobachten ist. Auch sonst waren keine nennenswerten Abweichungen von der letzten Tagung zu beobachten. Auch wenn ca. 80% der Teilnehmer aus dem Inland kamen, hatte sie doch das Flair eines internationalen Meetings mit Teilnehmern aus 39 auch nicht-europäischen Ländern.

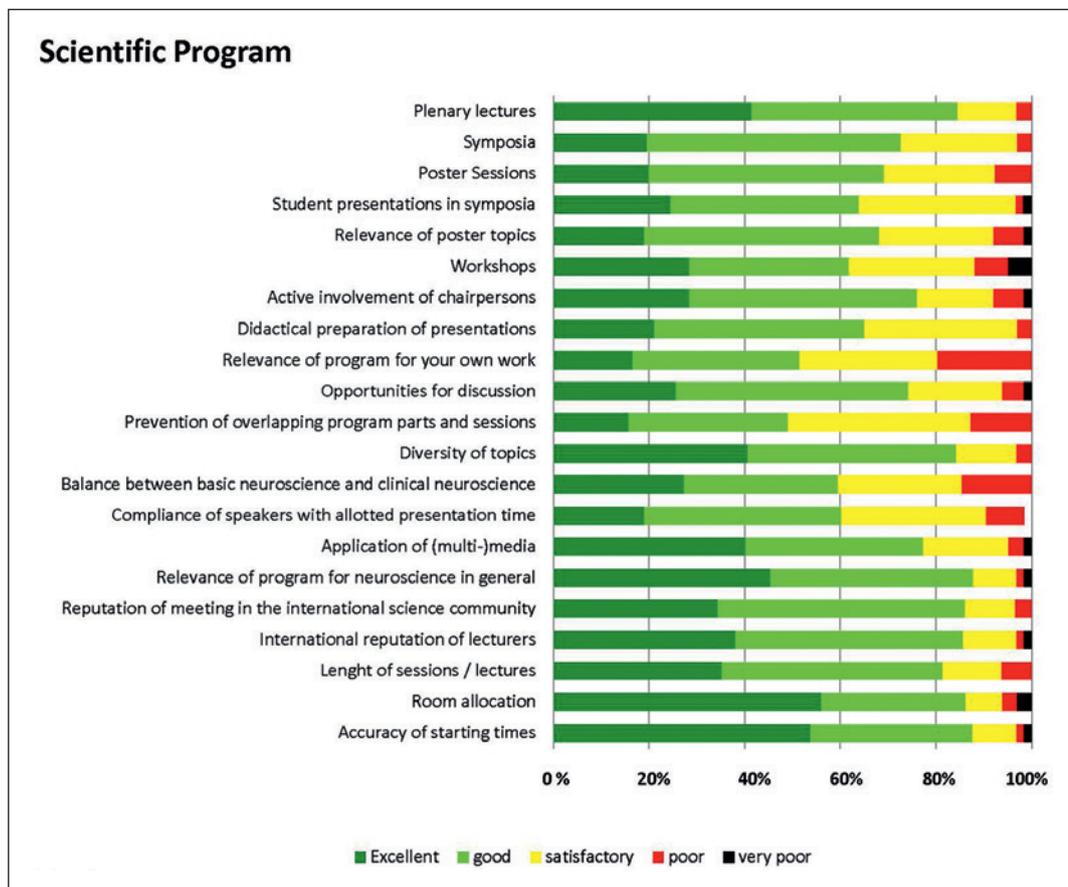


Abb. 1: Bewertung des wissenschaftlichen Programms durch die Teilnehmer

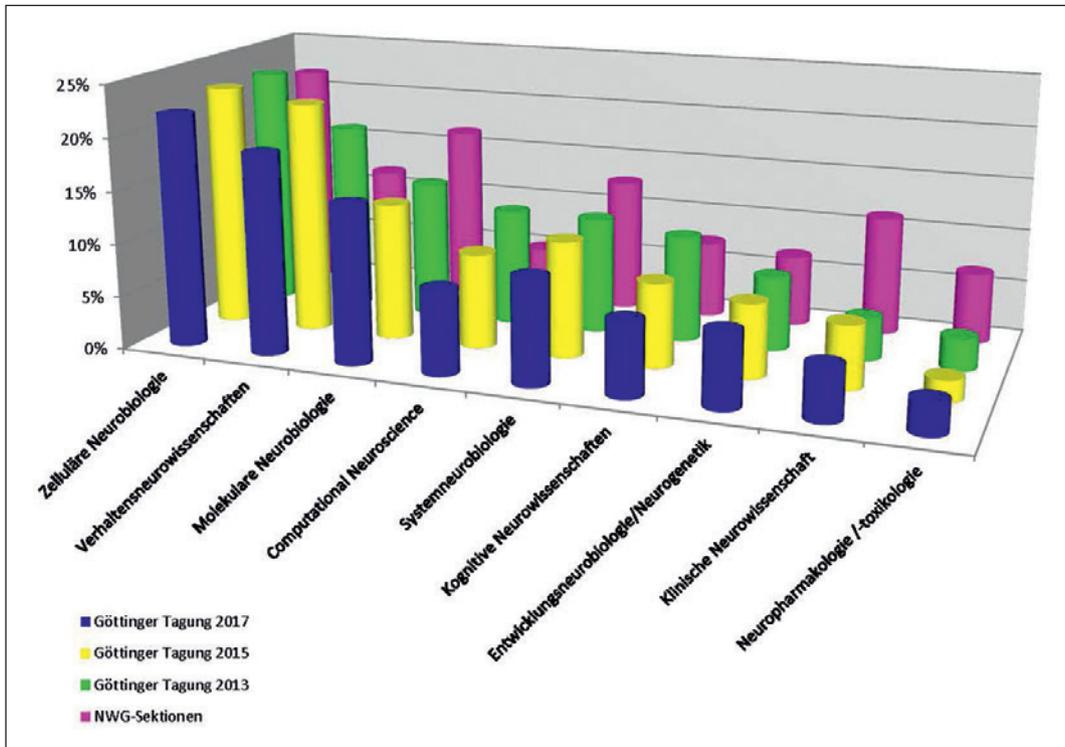


Abb. 2: Vergleich der Sektionsstärke innerhalb der NWG mit der Repräsentanz auf den Göttinger Tagungen 2013 – 2017

Die Auswahl der Hauptredner und Symposien fand großen Anklang bei den Teilnehmer, lediglich 3 % bewerteten beides in der Teilnehmerumfrage mit ungenügend. Bei den Symposien ist die Qualität auch der großen Anzahl an Vorschlägen (82) geschuldet, aus denen das Programmkomitee 2017 auswählen konnte. Dies ist sicherlich zum Teil auf die frühzeitige Bewerbung der Tagung bei den SFBs, GRKs und Forschergruppen zurückzuführen. Auch die Themenvielfalt des Programms, die internationale Reputation der Sprecher und der Tagung als Ganzes wurden zu über 80 % mit exzellent bis gut bewertet. Fünf der sieben Hauptredner waren aus dem Ausland, ebenso etwa die Hälfte der Redner in Symposien (94 von 191).

Nach wie vor wurde allerdings das immer noch unausgewogene Verhältnis von neurowissenschaftlicher Grundlagen- und klinischer Forschung bedauert. Hier sind die in den klinischen Neurowissenschaften tätigen Mitglieder aufgefordert, aktiv zu werden, denn die klinischen Neurowissenschaften liegen, wie der Vergleich der Sektionsstärken mit der Themenrepräsentation auf der Göttinger Tagung zeigt, deutlich unter ihren Möglichkeiten.

Bemerkenswert ist auch 2017 die starke Präsenz junger Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler unter 40 Jahren mit 85 %, wobei über die Hälfte aller Teilnehmer sogar jünger als 30 Jahre ist. Somit waren auch Doktoranden die am stärksten vertretene Berufsgruppe.

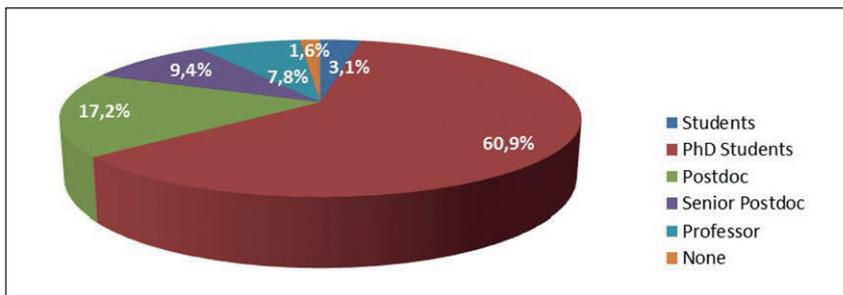


Abb. 3: Beruflicher Status der Teilnehmer

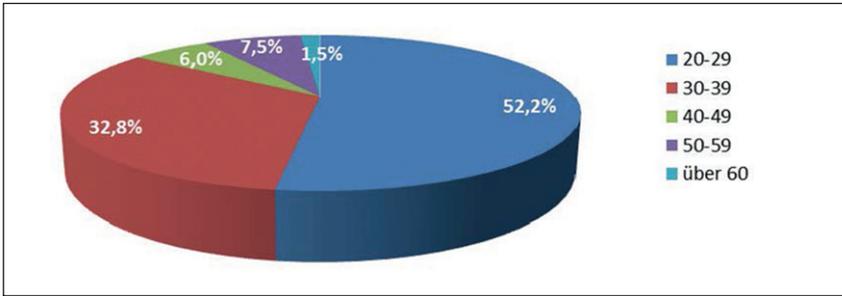


Abb. 4: Altersverteilung der Teilnehmer

Es zahlt sich aus, dass sich die NWG in vielerlei Hinsicht um diese jungen Kongressteilnehmer bemüht: viel Zeit im Programm für die Poster Sessions, die beiden Vortragslots, die in jedem der 36 Symposien für Studenten reserviert sind, die unschlagbar günstigen Teilnehmergebühren für Studenten mit 70 Euro, Kaffeepausen und Imbiss am Abend kostenlos, hochwertige Gewinne bei der Passport Competition, die Verlosung eines I-Pads für die

Abgabe der Kongressbewertung und, last but not least, die Göttinger Neuroparty – all diese Maßnahmen scheinen die Göttinger Tagung für ein junges Publikum attraktiv zu machen. Ein wenig bedauerlicher ist allerdings die Tatsache, dass die „Senioren“ der deutschen Neuroszene den Weg nach Göttingen, wo sicherlich viele von ihnen ihre ersten Kongresserfahrungen bei der Neurobiologentagung gesammelt hatten, kaum mehr finden: nur 1,5% der Teil-

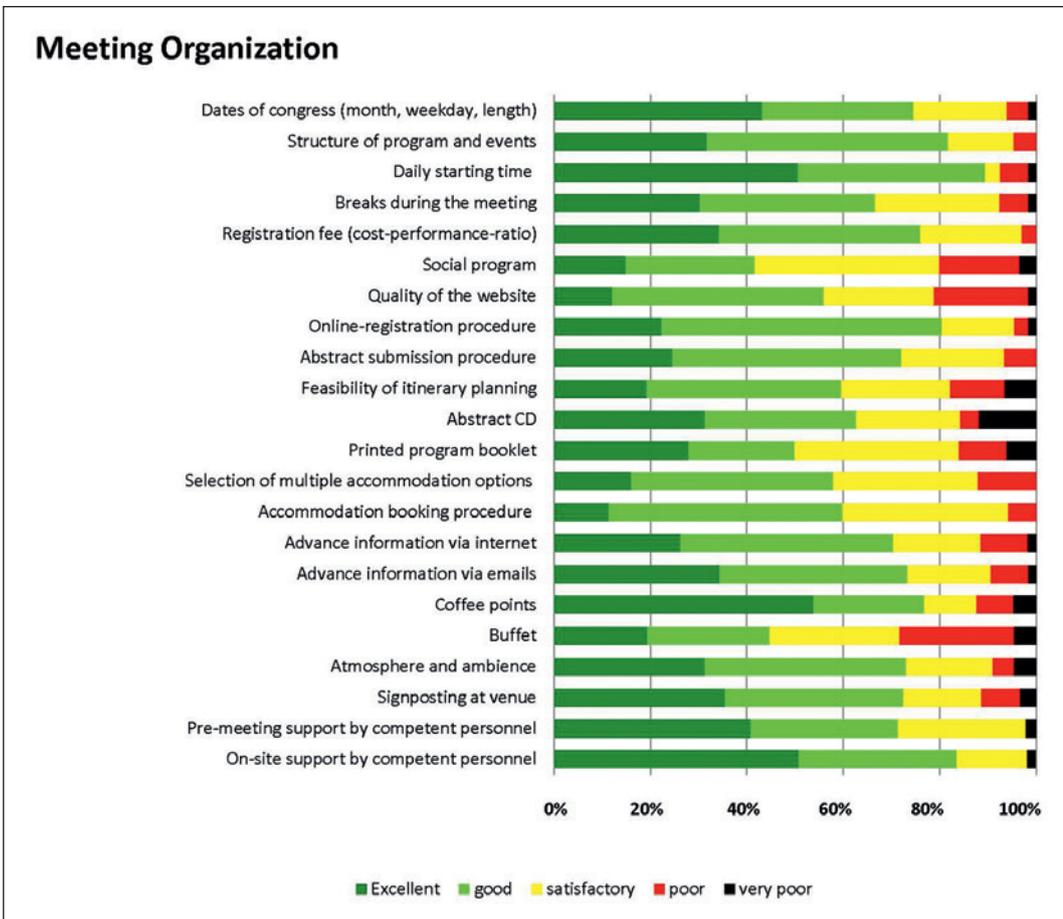


Abb. 5: Bewertung der Organisation der Tagung durch die Teilnehmer

nehmer sind älter als 60 Jahre. Hier würde man sich wünschen, dass mehr arrivierte Wissenschaftler die Tagung durch ihre Anwesenheit bereichern und den Jungen die Gelegenheit geben, auf Augenhöhe mit den „Big Shots“, die sie sonst nur aus Publikationen kennen, zu kommunizieren. Hier sollten sich die NWG-Mitglieder in diesem Alterssegment angesprochen fühlen.

Die Tagung wurde zum zweiten Mal in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Martin Göpfert als lokalem Organisator durchgeführt und die Erfahrung aus der Tagung 2015 hat die Beteiligten noch effektiver agieren lassen und die Kooperation mit der Geschäftsstelle der NWG noch weiter optimiert. Erfreulicherweise wird Martin Göpfert und seine Mannschaft auch die Tagung 2019 mittragen – never change a winning team! Die Teilnehmerbefragung bestätigt das: im Schnitt wird die Organisation von 80 % der Teilnehmer mit wenigstens zufriedenstellen bewertet, von 60 % sogar mit exzellent bis gut. Lediglich das Buffet

hat leider keine besonders gute Noten bekommen. Bedauerlicherweise hat die NWG aber hier wenig finanziellen Handlungsspielraum aufgrund der geringen Teilnehmergebühren: über 60 % der Teilnehmer bezahlen nur 70 Euro Tagungsgebühr. Es gibt kaum eine Tagung mit ähnlich internationalem Format, die hier mithalten kann. Nur das erfreulich große Interesse der Industrieaussteller an der Tagung (72 im Jahr 2017) ermöglicht es uns, kostenlose Leistungen wie Kaffeepausen oder das Buffet am Abend anzubieten. Diesen Industriepartnern gilt unser Dank ebenso wie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die Tagung mit Reisekostenzuschüssen für die ausländischen Redner wieder großzügig unterstützt hat.

Wie gesagt, nach der Tagung ist vor der Tagung: bitte merken sie sich den Termin der Tagung 2019 vor und halten sie die Tage vom 20. bis 23. März 2019 frei.

Stipendien für das FENS Forum 2018

Um dem besonderen Umstand Rechnung zu tragen, dass das FENS Forum 2018 in Berlin stattfinden wird (7. – 11. Juli 2018), hat die NWG ihr Budget für Reisestipendien für den Besuch dieses Forum um 50 % erhöht. Sie stellt somit 15.000 Euro für 30 Stipendien à 500 Euro zur Verfügung. Bewerben können sich NWG-Mitglieder im In- und Ausland. Die Auswahl wird von einem Gremium, das sich aus Vorstandsmitgliedern zusammensetzt, getroffen.

Folgende Kriterien sind für eine Bewerbung zu erfüllen:

- Bewerben können sich Doktoranden und junge Postdocs,
- die zum Zeitpunkt der Bewerbung nicht älter als 35 Jahre sind,
- die mit einem eigenen Beitrag teilnehmen und
- Erstautor dieses Beitrags sind und
- die NWG-Mitglieder sind, egal ob sie im In- oder Ausland leben und arbeiten.



Die Bewerbung hat über die Homepage (<http://nwg-info.de/>) der NWG zu erfolgen, das Bewerbungsformular öffnet Anfang Dezember 2017. Folgende Unterlagen sind entweder auf Englisch oder auf Deutsch einzureichen:

- Lebenslauf (max. 1 Seite)
- Publikationsliste (falls vorhanden)
- das Abstract der beim FENS Forum präsentierten Arbeit
- ein kurzes Empfehlungsschreiben

Eine Bewerbung um ein Stipendium ersetzt NICHT die Registrierung für das FENS Forum. Diese muss unabhängig von der Stipendienbewerbung durchgeführt werden.

Bewerbungsschluss ist der 13. Februar 2018.

Kursprogramm 2018 der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e. V.

19. – 21. Februar 2018

Transcranial Stimulation and Neuronal Oscillations

Anmeldeschluss: 1. Februar 2018

Ort der Veranstaltung: Klinik Klinische Neurophysiologie, Universitätsmedizin Göttingen, Robert-Koch-Straße 40, 37075 Göttingen

Themen: Transcranial magnetic-, direct current-, alternating current and random noise stimulation, theoretical background of the stimulation, modelling, research and clinical applications; neuronal oscillations, cognition, network activity

Organisation und Anmeldung: apl. Prof. Andrea Antal, Tel.: 0551 398461, Fax: 0551 398126, E-Mail: AAntal@gwdg.de

26. Februar – 2. März 2018

Anatomy of the Human Central Nervous System

Anmeldeschluss: 19. Januar 2018

Ort der Veranstaltung: Center for Biomedical Research (ZBF), Helmholtzstr. 8/1, 89081 Ulm

Themen: Introduction into neuroanatomical techniques to study the neuroanatomy of the human brain; Anatomy of the human spinal cord, brainstem, diencephalon and telencephalon; Pathological anatomy of the human brain and spinal cord in neurodegenerative disorders

Organisation und Anmeldung: Prof. Dr. Deniz Yilmazer-Hanke, Tel. (Office): 0731/500-45866, Tel. (Lab): 0731/500-56393, E-mail: deniz.yilmazer-hanke@uni-ulm.de

15. – 16. März 2018

Behavioral Testing in Rodents

Anmeldeschluss: 16. Februar 2018

Ort der Veranstaltung: Interdisciplinary Neurobehavioral Core INBC, University of Heidelberg INF 515; 69120 Heidelberg

Themen: Behavioral testing in rodents: from cognition, motor function, emotion, anxiety to pain. A hands-on course

Organisation und Anmeldung: Dr. Claudia Pitzer, Tel.: 06221 1858504, E-Mail: Claudia.Pitzer@Pharma.uni-Heidelberg.de, Web: <http://www.medizinische-fakultaet-hd.uni-heidelberg.de/Home.111344.0.html>

23. – 24. April 2018

Cerebral Ischemia: in vivo and in vitro Models

Anmeldeschluss: 5. März 2018

Ort der Veranstaltung: Abteilung für Experimentelle Neurologie/Zentrum für Schlaganfallforschung, Charité Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin

Themen: Compact introduction to the pathophysiology of cerebral ischemia and the preclinical methods used to study it, including video and live demonstrations of the most relevant in vitro and in vivo models of cerebral ischemia (in particular stroke), and behavioral analysis, with a special focus quality aspects, pitfalls, and clinical relevance.

Organisation und Anmeldung: Gabriela Seidel-Hart, Tel.: 030 4505 60122, Fax: 030 4505 60942, E-Mail: gabriela.seidel@charite.de

23. – 25. April 2018

Multiple Target Identification in the Nervous System

Anmeldeschluss: 31. März 2018

Ort der Veranstaltung: Johannes Gutenberg University Medical Centre, Department of Physiological Chemistry, Duesbergweg 6, 55128 Mainz

Themen: Introduction to the theory of and extensive hands-on training in the in situ hybridisation technique. Particular attention will be paid to: (i) biological sample preparation; (ii) probe design and labeling; (iii) signal amplification; (iv) analysis and evaluation of obtained data; (v) detailed troubleshooting for all steps required. This year's special focus will be simultaneous detection of mRNA and protein molecules in the nervous system (<http://www.site-of-kriszta.eu/nwg-course>).

Organisation und Anmeldung: Dr. Krisztina Monory, Tel.: 06131 39 24 551, Fax.: 06131 39 23 536, E-mail: monory@uni-mainz.de

20. – 21. September 2018

Functional Neuroanatomy of the Mouse II: Dorsal Thalamus and Telencephalon

Anmeldeschluss: 15. Juni 2018

Ort der Veranstaltung: Zentrum Anatomie, Universitätsklinik Köln, Gebäude 35, Joseph-Stelzmann-Straße 9, 50924 Köln

Themen: Introduction into the functionally important thalamic nuclei and their relation to the cerebral cortex, hippocampus with Excursus: Models of Alzheimer's.

Organisation: Prof. Dr. Hannsjörg Schröder

Anmeldung: Frau Petra Lück, Tel.: 0221 478 5000, Fax: 0221 478 5318, E-Mail: schroeder.anatomie@uni-koeln.de, E-Mail: petra.lueck@uk-koeln.de

24. – 28. September 2018

Imaging of the Synaptic Organization

Anmeldeschluss: 1. Juni 2018

Ort der Veranstaltung: LIN Leibniz Institute for Neurobiology, Brenneckestraße 6, 39118 Magdeburg

Themen: Live cell imaging of synaptic function, multichannel 3D STED, lightsheet, single particle tracking-PALM, single particle tracking (QDots), Ca-imaging (GCaMP), FLIM/FRET, 3D image analysis, deconvolution

Organisation: Werner Zuschratter, Special Laboratory Electron- & Laserscanning Microscope, Martin Heine, Research Group Molecular Physiology

Anmeldung: Ines Kaiser, Combinatorial NeuroImaging Core Facility (CNI), Leibniz Institute for Neurobiology, Tel.: 0391 6263 92182, E-Mail: cni-reg@lin-magdeburg.de

26. – 29. September 2018

Social Neuroscience in Rodents

Anmeldeschluss: 1. Juli 2018

Ort der Veranstaltung: Behavioral Neurosciences, Faculty of Psychology, Philipps-University of Marburg, Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg

Themen: Behavioral phenotyping and ultrasonic vocalizations in rodent models of neuropsychiatric disorders: maternal and play behavior; social interaction; communication (affective, ultrasonic, olfactory); recording/analysis and playback of ultrasonic vocalizations; behavioral analysis; in vivo pharmacology and electrophysiology; stereological analysis of neuronal activity and plasticity, animal models of autism, schizophrenia, and of anxiety, depression

Organisation und Anmeldung: Dr. Markus Wöhr, Tel.: 06421 2823612, Fax: 06421 2823610, E-Mail: markus.woehr@staff.uni-marburg.de

7. – 12. Oktober 2018

Analysis and Models in Neurophysiology

Anmeldeschluss: 30. Juni 2018

Ort der Veranstaltung: Bernstein Center Freiburg, Hansastr. 9a, 79104 Freiburg

Themen: Lectures and exercises in Mathematica and Matlab about: neuron models and point processes, local field potentials, functional Imaging; neural decoding

Organisation und Anmeldung: Birgit Ahrens, Tel.: 0761 203 9575, Fax: 0761 203 9559, E-Mail: nwg-course@bcf.uni-freiburg.de

10. – 11. Oktober 2018

Tübingen Systems Neuroscience Symposium 2018

Anmeldeschluss: 15. September 2018

Ort der Veranstaltung: MEG-Zentrum der Universität Tübingen, Otfried-Müller-Straße 47, 72072 Tübingen

Themen: Das jährliche Symposium bringt führende Wissenschaftler der systemischen Neurowissenschaften zusammen. Das Themenspektrum der Veranstaltung reicht von neurophysiologischen Untersuchungen an Tieren bis zu funktionell-bildgebenden Studien am Menschen (MEG, EEG, fMRI). Ein Schwerpunkt des Symposiums liegt in der Präsentation aktueller Methoden. Die Vorträge richten sich an Studenten und Wissenschaftler mit einem fundierten Basiswissen.

Organisation und Anmeldung: Prof. Dr. Christoph Braun, Tel: 07071 29 87706, Fax: 07071 29 5706, E-Mail: christoph.braun@uni-tuebingen.de

Details unter http://nwg-info.de/aktivitaeten/kurse_workshops/2018

Neueintritte

Folgende Kolleginnen und Kollegen dürfen wir als Mitglieder der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft begrüßen:

Azevedo, Tiago M. (Cambridge, UK)
Bender, Franziska (Berlin)
Färfers, Marcel (Düsseldorf)
Gardner, Wilf (Freiburg)
Gollin, Arne (Bielefeld)
Gualtieri, Dr. Fabio (München)

Lee, Prof. Suk-Ho (Seoul, South Korea)
Marter, Dr. Kathrin (Magdeburg)
Nitzan, Noam (Berlin)
Tudja, Szabina (Freiburg)
Wieters, Frederique (Köln)
Wild, Benedict (Göttingen)

Der Mitgliedsstand zum 1. September 2017 beträgt 2.202 Mitglieder.

Ausblick

Für die nächsten Ausgaben von *Neuroforum* werden folgende Beiträge vorbereitet:

Krug, Kristine

Die neuronalen Signale, die Wahrnehmung verändern

Windmann, Sabine

Altruismus aus Sicht der Sozialen Neurowissenschaften

Busse, Laura

Einfluß von Locomotion auf die sensorische Informationsverarbeitung und die zugrundeliegenden neuronalen Schaltkreise

Löwel, Sigrid

Lebensbedingungen haben einen starken Einfluß auf die Plastizität des Gehirns

Liss, Birgit

Selective degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: emerging roles of altered calcium homeostasis and nucleolar function

Preview

The following contributions are in preparation for the next issues of *Neuroforum*:

Krug, Kristine

The neural events that change perception

Windmann, Sabine

Altruism from the Perspective of the Social Neurosciences

Busse, Laura

Influence of Locomotion on sensory information processing and the underlying neuronal circuits

Löwel, Sigrid

Environmental conditions strongly affect brain plasticity

Liss, Birgit

Selective degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: emerging roles of altered calcium homeostasis and nucleolar function

Neurowissenschaften in der gymnasialen Oberstufe

Schuljahr

2017/2018

<http://nwg-info.de/>



Programmübersicht

Die Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. (NWG) bietet bundesweit kostenlose Fortbildungsveranstaltungen für (Oberstufen-)LehrerInnen an. Interessierte LehrerInnen sind herzlich zur Teilnahme eingeladen.

4. Oktober 2017 | Freiburg

Modellsysteme in der Neurobiologie

Kontakt: Anne Karina Feldmeth
Tel.: 0761 2039575
E-Mail: anne.karina.feldmeth@bcf.uni-freiburg.de

8. November 2017 | Berlin

Neues aus der Hirnforschung

Kontakt: Helga Fenz
Tel.: 030 94892931
E-Mail: helgafenz@aol.com

22. Februar 2018 | Tübingen

Moderne Mikroskopie in den Neurowissenschaften

Kontakt: Prof. Dr. Uwe Ilg
Tel.: 07071 2987602 (Hertie-Institut)
07071 2982377 (Schülerlabor)
E-Mail: uwe.ilg@uni-tuebingen.de

7. März 2018 | Berlin

Serotonin, Sport und die Neubildung von Nervenzellen

Kontakt: Dr. Luiza Bengtsson
Tel.: 030 94062513
E-Mail: LaborTrifftLehrer@mdc-berlin.de

16. März 2018 | Berlin

Neurodegenerative Krankheiten verstehen

Kontakt: Dr. Luiza Bengtsson
Tel.: 030 94062513
E-Mail: LaborTrifftLehrer@mdc-berlin.de

21. März 2018 | Karlsruhe

Über das Vergessen lernen – Alzheimer im Biologie-Unterricht

Kontakt: Prof. Dr. Stefan Kins
Tel.: 0631 205-2106/2107
E-Mail: l.hanke@biologie.uni-kl.de

13. April 2018 | Heidelberg

Molekularbiologie in der Hirnforschung – Gene meets Brain

Kontakt: Prof. Dr. Andreas Draguhn/Susanne Bechtel
Tel.: 06221 544056
E-Mail: susanne.becht@physiologie.uni-heidelberg.de

18. Juni 2018 | Berlin

Wahrnehmung – Vorträge und Besuch der interaktiven Ausstellung »SinnReich«

Kontakt: Prof. Dr. Helmut Kettenmann
Tel.: 030 9406 3336
E-Mail: gibson@mdc-berlin.de

13. März 2018 | Magdeburg

15. Magdeburger Tag der Erziehung – Transgenerationale Auswirkung perinataler (psycho-)toxischer Umwelt auf die Entwicklung von Gehirn und Verhalten

Kontakt: Prof. Dr. Katharina Braun
Tel.: 0391 6755001
E-Mail: madeleine.stiefel@ovgu.de

14. März 2018 | Leipzig

Das Gehirn verstehen und begreifen – die Sinnessysteme Hören und Tasten

Kontakt: Prof. Dr. Steffen Rossner / Dr. Max Holzer
Tel.: 0341 9725758 / 0341 9725759
E-Mail: rossn@medizin.uni-leipzig.de oder
holm@medizin.uni-leipzig.de

Neurowissenschaftliche
Gesellschaft e.V.

Geschäftsstelle

Max Delbrück Centrum für
Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch

Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

Tel.: +49 30 94063336

Fax: +49 30 94062813

E-Mail: gibson@mdc-berlin.de

Für die Anmeldung zur jeweiligen Veranstaltung
wenden Sie sich bitte an den lokalen Kontakt.

Weiteres Informationsmaterial für Lehrer
finden Sie auf der Homepage der NWG:

> Kosmos Gehirn als Download

<http://nwg-info.de/sites/nwg-info.de/files/media/pdf/kosmos-gehirn.pdf>

> Kleines Sachwörterbuch der Neurowissenschaften

<http://nwg-info.de/aktivitaeten/lehrerfortbildung/links/glossar>

> Unterlagen zur Lehrerfortbildung

<http://nwg-info.de/aktivitaeten/lehrerfortbildung/links/skripte>

Das Internetportal zum Thema
Neurowissenschaften:

<http://www.dasGehirn.info>

Ein Projekt der Gemeinnützigen
Hertie-Stiftung,
der Neurowissenschaftlichen
Gesellschaft e.V.
in Zusammenarbeit
mit dem ZKM
Zentrum für Kunst und
Medientechnologie
Karlsruhe.

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V.

Beitrittserklärung:

Hiermit erkläre ich meinen Beitritt zur Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.

Eintrag in das Mitgliederverzeichnis

Name

Vorname

Titel

Dienstadresse

Universität/Institut/Firma

Straße

PLZ, Ort

Tel./E-Mail

Privatadresse

Straße

PLZ, Ort

Tel.

Datum/Unterschrift des neuen Mitglieds

Ich unterstütze den Antrag auf Beitritt zur Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.:

Datum/Unterschrift

Ich unterstütze den Antrag auf Beitritt zur Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.:

Datum/Unterschrift

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V.

Stefanie Korthals

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Zelluläre Neurowissenschaften

Robert-Rössle-Straße 10

13092 Berlin

Ich optiere für folgende 2 Sektionen: (bitte ankreuzen)

- Verhaltensneurowissenschaften
- Zelluläre Neurobiologie
- Entwicklungsneurobiologie und Neurogenetik
- Neuropharmakologie und -toxikologie
- Systemneurobiologie
- Molekulare Neurobiologie
- Klinische Neurowissenschaften
- Computational Neuroscience
- Kognitive Neurowissenschaften

Ich bin Student ja nein
(Bescheinigung anbei)

Ich bin weiblich männlich

Jahresbeitrag:

(bitte ankreuzen)

- 70,- €/Jahr ordentliches Mitglied
- 30,- €/Jahr Studenten, Mitglieder im Ruhestand, Arbeitslose

Überweisung:

Bankverbindung: Berliner Bank AG,
IBAN: DE39 1007 0848 0463 8664 05
BIC: DEUTDEBD110

Einzug über VISA-Kreditkarte:

Einzug über EUROcard:

Kartenummer _____

Exp. Date _____

Betrag _____

Name _____

Unterschrift _____

Bankeinzugsermächtigung:

Ich ermächtige die Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. von meinem Konto

bei der Bank _____

IBAN _____

BIC _____

einmal jährlich den Mitgliedsbeitrag in Höhe von € _____ einzuziehen

Ort, Datum _____

Unterschrift _____

Kontoinhaber _____

Anschrift _____

11th FENS Forum of Neuroscience

7-11 July 2018 | Berlin, Germany

Organised by the Federation of European Neuroscience Societies (FENS)
Hosted by The German Neuroscience Society



The 20th Anniversary of FENS

Where European neuroscience meets the world

SAVE THE DATE

FENS Forum 2018 has an exciting scientific programme, together with the 'Bridging Knowledge Session', special interest events, satellite events, networking events, business meetings and much more.

List of themes:  Development • Excitability, synaptic transmission, network functions • Disorders of the nervous system • Sensory and motor systems • Sleep, autonomic and neuroendocrine systems • Cognition and behaviour • Computational neuroscience • Novel Methods and Technology Development.

KEY DATES

1 July 2017: Preliminary scientific programme online

1 Dec 2017 – 13 Feb 2018: Early registration and abstract submission

1 Dec 2017 – 13 Feb 2018: FENS-IBRO/PERC travel grants applications

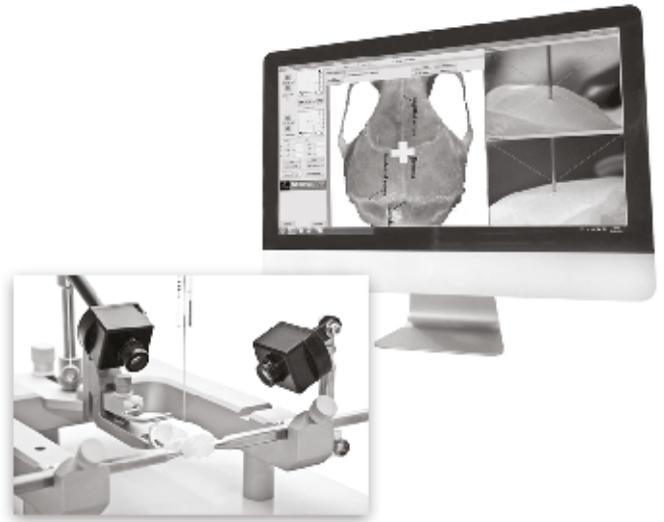


Drill and Injection Robot



- High Throughput Drill & Inject
- Multiple Animal Procedures
- Multisite Injections
- No Tool Exchange

Smart BregmaFinder



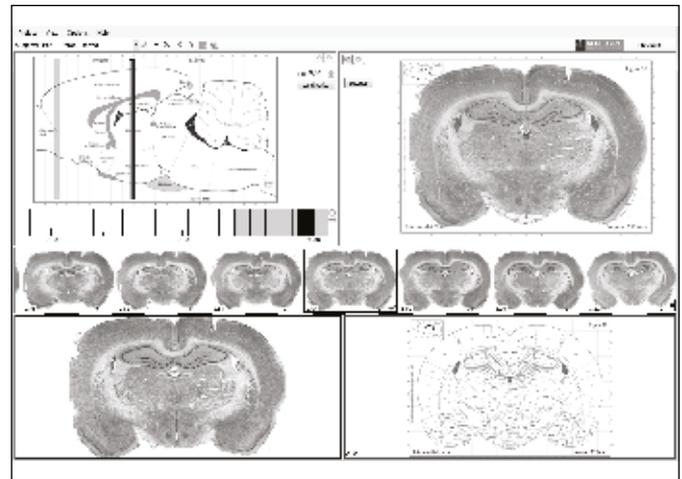
- Bregma Detection
- Camera-Driven Positioning
- Experiment Monitoring
- Video Streaming

Glass Capillary Injector



- Ultraprecise Nanoinjection
- Wireless Injection Control
- *In Vitro* or *In Vivo* Experiments
- PC and SmartPhone Control

HistoMatch



- Histology Slice Digitization
- Smart Atlas Matching
- Intuitive Slice Manipulation
- Easy and High Throughput